

123

LAWYERS' AND MERCHANTS' TRANSLATION BUREAU, INC.

Legal, Financial, Scientific, Technical and Patent Translations

**11 BROADWAY
NEW YORK, NY 10004**

Certificate of Accuracy

TRANSLATION

From Spanish Into English

**STATE OF NEW YORK
COUNTY OF NEW YORK**

} s.s.:

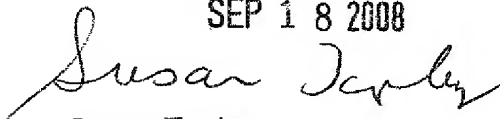
On this day personally appeared before me
who, after being duly sworn, deposes and states:

That I, Elisabeth A. Lucas, Authorized Officer of **LAWYERS' AND MERCHANTS'
TRANSLATION BUREAU** declare

That to the best of my knowledge and belief, the attached document, prepared by one
of its translators competent in the art and conversant with the Spanish and English
languages, is a true and correct translation into the English language of the accompanying
document.

**SUBSCRIBED AND SWORN TO BEFORE ME
THIS**

SEP 18 2008



Susan Tapley

Notary Public, State of New York
No. 01TA4999804
Qualified in Queens County
Certificates filed in New York County
and Kings County
Commission expires July 27, 2010



DESCRIPTION

FIELD OF THE INVENTION

The present invention relates to a DNA vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, especially in aquaculture species, such as the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout, based on a DNA fragment that codes for the heat stress protein 10 (HSP10), and the method of preparation thereof. The invention also describes a DNA segment for use in the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates and a vaccine based on a recombinant protein prepared from the genetic information contained in this oligonucleotide.

BACKGROUND

DESCRIPTION OF THE PRIOR ART

Salmon Rickettsial Syndrome (SRS)

The intracellular bacterium *Piscirickettsia salmonis*, the causative agent of the disease called Salmon Rickettsial Syndrome (SRS), has been, since just before its identification (Fryer et al., 1990), an increasing problem for the salmon industry in Chile. Initially described as a

pathology that only affected the Coho salmon, it then spread to the trout and to the Atlantic salmon. However, the situation was made worse not only by the spread of the disease to other salmonid species cultivated in this country, but also because during the past decade this disease has become more virulent, and year after year the associated mortality, the costs of treatment and the effects on productivity and on the quality of the final product have increased.

Measures for mitigating the disease that are currently employed at cultivation centers are mainly based on treatments with antibiotics and other management measures such as the application of rest periods between productive cycles, in order to avoid horizontal transmission, the use of some commercially available immunostimulants, and limitation of vertical transmission, by means of expensive methods of reproductive selection. In the absence of effective vaccines, the steps enumerated above are the only weapons that the fish farmer has used for limiting the effects of the disease.

Not all of these methods are fully developed, nor fully incorporated in the production methodologies, and in some cases they are not applied completely or correctly. The end result is the appearance of strains of *Piscirickettsia* of greater virulence, and interaction with other bacterial, viral and parasitic diseases that have been added year by year to the list of diseases that the fish farmer has to

contend with. This explains why the situation has worsened over the years.

There is still no real solution to Salmon Rickettsial Syndrome. Treatments with antibiotics are becoming less and less effective. Their successful application is uncertain and there is only a response when they are applied very early, and in many cases the administration of the antibiotic by injection is the only feasible solution. In the medium term, the only viable solution will be to use vaccines for immunizing the fish, before they are exposed to the conditions of marine cultivation, where horizontal propagation of the disease is very efficient, since the survival of the bacterium in fresh water is very low.

The vaccines currently being marketed consist of bacterins with restricted use and with scant documentation regarding their efficacy. Furthermore, the production of bacterins for SRS is very expensive, owing to the complexity of the system for cultivation of the pathogen. The in-vitro production of *Piscirickettsia*, an obligate intracellular bacterium, requires the inoculation of the bacterium on a culture of the appropriate cell line. The fact that these bacterins are produced in the complex systems just described has effects on the level of control of the antigens produced; thus, it is possible that the bacteria grown do not contain the antigens or do not contain them at the level required for

inducing the desired protection. An alternative to bacterins is the directed production of antigens, by cloning the genes that encode the desired antigens of the pathogen in a bacterium that is easier to cultivate, for producing the antigens. The production of vaccines by this technique gives rise to what are known as recombinant DNA vaccines. There are two possible presentations for this type of vaccine: suspension of attenuated cells in a suitable type of coadjuvant (generally of the oily type), or suspension of the fractionated antigens from the cultivated bacterium in a suitable coadjuvant. In both cases some postvaccination side effects are to be expected, manifested as a decrease in growth for some weeks following vaccination, and some peritoneal adhesions, that might affect the quality and/or growth of the fish. The latest generation of vaccines are the DNA vaccines, consisting of injection of minimal amounts of genetic material that encodes specific antigens of the pathogen. In this way, the host begins to produce the encoded antigens *in situ*. The genetic material introduced will have an average life of a few days, after which it disappears, after fulfilling its function.

ANALYSIS OF THE PRIOR ART

Vaccines in aquaculture, vaccines for SRS

General background

The national salmon industry has now developed into an important source of foreign currency for this country, generating employment and permitting the development of other companies associated with the sector. In 1998, the net national production of salmon and trout reached a volume of 181 600 tons, generating foreign currency to a total of US\$ 713.5 million (see Salmonoticias No. 72; p. 4-6; 1999). However, this activity has not been without problems, and to the accusation of dumping and the sharp decline of the Japanese market, the main destination of Chilean salmon, must be added the economic losses arising because the salmon are dying. The mortality of salmon in captivity is due to various factors, among which we may mention the activity of predators, poor sanitary procedures, and the high density of fish per cage. Nevertheless, it is diseases, and principally those caused by infectious agents, that are characterized by causing massive losses (see Salmonoticias No. 71; p. 12-13 and No. 72; p. 18-19; 1999). At present the specimens produced in Chile are mainly attacked by microorganisms such as *Renibacterium salmoninarum*, the causative agent of BKD

(Bacterial Kidney Disease) and another of a rickettsial nature such as *Piscirickettsia salmonis* that is the causative agent of rickettsial syndrome of salmonids, a pathology that has undoubtedly caused the greatest losses for the salmon industry in Chile. The amount of money that is lost due to this disease has been evaluated at more than US\$ 100 million annually, if we include both the direct costs in terms of mortality, treatment, feeding, as well as the loss of potential profits (Obach A., et al., 1998). Another infectious agent that is causing problems in this sector is a virus belonging to the genus *Birnaviridae* known as Infectious Pancreatic Necrosis Virus (IPNV) (Bruno D., and Poppe T., 1996). This virus possesses a double-stranded RNA that causes a serious clinical picture in the fish infected, resulting in substantial mortality (Bustos P., et al., 1999). More recently, there are fears concerning the appearance of another virus that causes infectious anemia in salmon or ISAV (see Salmonoticias No. 71; p. 11; 1999 and Cassigoli J., 1999). Finally, the mycotic agents, such as those belonging to the genus *Saprolegnia*, are also a constant threat to all the species of salmonids grown in Chile (Enríquez R., 1999).

Salmon Rickettsial Syndrome appeared for the first time in 1989 in the south of Chile and was reported in Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), but it was then found that it also affected the Atlantic salmon (*Salmo salar*), Chinook salmon (*O. tshawytscha*), rainbow trout (*O. mykiss*), among

other species of salmonids (Bravo and Campos, 1989). The clinical signs that characterize a fish affected with rickettsial syndrome are swimming on the surface of the water, lethargy, anorexia, approaching the shore, impact against the walls of the cages and darkening of the skin. The most important macroscopic external lesions include desquamation, paleness of the gills, ecchymotic hemorrhages and petechiae at the base of the fins, skin nodules and ulcers, and the hematocrit levels reflect severe anemia (Elizalde J., 1993). Autopsy of the abdominal cavity often reveals the presence of ascitic liquid, nephromegaly and splenomegaly, whitish nodules in the liver, presence of a pseudomembrane in the heart and petechial hemorrhages in the stomach, intestine, swim bladder, muscular and visceral fat. In the majority of cases, the intestine is filled with yellowish mucous contents and the stomach with a clear, seromucous liquid. From the histopathological standpoint the main lesions correspond to necrosis in various organs and tissues, with the kidney, liver, intestine and brain being the most affected. In addition, macrophages containing microorganisms within the cytoplasm may be found (Larenas et al., 1998).

The etiological agent of this syndrome was identified for the first time in 1990 by Fryer (Fryer et al., 1990); however, it was not until 1992 that the relation of this bacterium with other species of rickettsias could be

established more specifically, determining, from the sequence of the 16S RNA gene, the origin of a new genus and a new species that was named *Piscirickettsia salmonis* (ATCC UR 1361) (Fryer et al., 1992). The bacterium is characterized by being Gram-negative, pleomorphic, immobile, nonencapsulated, coccoid, varying in size between 0.5 and 1.5 μm . In culture, this pathogen only grows in salmon cell lines, such as CHSE-214 cells, within cytoplasmic vacuoles associated with others forming clusters of bacteria, although it has also been observed as isolated rings. It stains with Giemsa's reagent, hematoxylin-eosin, methylene blue, among others. Using electron microscopy, it was observed that this bacterium has two membranes, one external undulating and one internal cytoplasmic, as has been observed in other rickettsial agents. Using the same technique, it was possible to demonstrate the presence of structures similar to ribosomes near the plasma membrane, a fibrillar DNA in the central region and electron-dense spherical structures (Larenas et al., 1998).

Preventive measures

SRS has now been controlled partially by the use of antibiotics, which have not proved completely effective in combating the disease. Antibiotics with better prospects for the treatment of SRS include the quinolones, on account of

their broad spectrum, low CMI and intensively bactericidal action. However, these drugs have side effects, such as the development of resistance in the pathogens, toxicity, hypersensitivity and immunosuppression (Arriagada R., 1996). The use of antibiotics has problems connected with regulations approved in 1997 by the FDA of the United States of America and by the European Economic Community that will require that all products from aquaculture will have to reach their respective markets without residues of antibiotics. This will undoubtedly be a problem for Chilean producers, bearing in mind that in Chile, 80% of the antibiotics available on the national market are intended for combating *P. salmonis* (see Aquanoticias No. 37; p. 20; 1997).

Bacterins and vaccines based on recombinant proteins

Recently, Smith et al. (1995) described the results of partial protection obtained on immunizing Coho salmon with a conventional bacterin for *P. salmonis*, prepared with the ATCC strain of the pathogen grown in CHSE-214 cells and then fixed with paraformaldehyde. The fish were challenged naturally, that is by transferring them after smolting to a site with endemic piscirickettsiosis.

Gaggero submitted in 1995 a Chilean patent application (Gaggero, 1995) relating to a method of production of a vaccine against Salmon Rickettsial Syndrome

produced by the bacterium *Piscirickettsia salmonis*. The method described in said patent application comprises a process for production of an inactivated vaccine, of the bacterin type. For this, initially the bacterium must be propagated in fish cell cultures and, once purified, it is inactivated and diluted in a suitable solvent, and is then ready for use by injection.

Vaccines based on recombinant proteins are another possibility. If we succeed in identifying antigens involved in the humoral and/or cellular immune response of salmonids against *P. salmonis*, it is possible, using the methods of molecular biology, to clone and express these molecules in suitable vectors, whether in bacteria, yeasts or animal cells, and then study their protective character. Methods of this type have been used in the investigation of numerous pathologies that affect humans, and among them, some of the diseases that are caused by bacteria of the genus *Rickettsia*.

In the case of scrub typhus (tsutsugamushi fever), caused by *R. tsutsugamushi*, it was determined that two polypeptides are present, with molecular weights of 56 and 58 kDa, localized on the surface of the bacterium, which are said to be predominant in the infection (Tamura et al., 1985) and whose genes have been cloned (Stover et al., 1990 a). In the case of Rocky Mountain fever, caused by *R. rickettsii*, the gene for a protein of 155 kDa, localized in the cell wall of the bacterium, has been identified and cloned, and the

presence of heat-sensitive epitopes has been determined using monoclonal antibodies. This antigen, when inoculated in mice, protects them from the lethal effect of the bacterium (McDonald et al., 1987). It is interesting to note that a similar protein of 155 kDa has been identified in *Rickettsia conorii* and the gene that encodes it has been cloned and expressed in *E. coli*. When guinea pigs are inoculated with a lysate of the recombinant bacterium, protection is obtained against infection with the homologous strain of *Rickettsia conorii* as well as partial protection against experimental infection with a heterologous strain like *Rickettsia rickettsii* (Vishwanath et al., 1990).

DNA VACCINES

The development of new strategies of vaccination against *P. salmonis* is justified by the fact that to date the disease has not been controlled and only one commercial vaccine of the bacterin type is approved at present, but its results are controversial for experts in animal health with reference to SRS (see Aquanoticias No. 47; p. 7; 1999). There are several vaccines at the experimental stage, five of them are of the bacterin type, one is an isolated protein (purified antigen) and one is based on recombinant DNA (see Aquanoticias No. 47; p. 9; 1999). The production of a vaccine of the bacterin type involves the culture, purification and

subsequent inactivation of the bacterium. The cultivation process can take up to 2 weeks when there are no problems of contamination, a fact that is not trivial when dealing with the cultivation of a bacterium that in cell culture is practically sensitive to all antibiotics. The purification process is expensive, slow and unsuitable for scaling-up as would be required for mass vaccination of millions of salmon. It has also been demonstrated that vaccination with bacterins requires adjuvants for potentiation of the immune response of the fish and booster doses, a situation that leads to rejection by the salmon farmers because it involves double manipulation of the fish, which can generate such a high level of stress that it can cause higher mortality than might result from a possible outbreak of SRS (see *Aquanoticias* No. 47; p. 8; 1999). Moreover, no works are known in which it is demonstrated that bacterins are able to induce cellular immunity, which is very important when dealing with pathogens that live within the cell, such as *P. salmonis*. On the other hand, vaccination with pure antigens also leads to problems, among which we may mention the fact that they are proteins, usually obtained from recombinant DNA, that are cloned and expressed in microorganisms, generally produced within inclusion bodies, from where they must be recovered and purified, a process that takes time and increases the costs of production. Moreover, once obtained, the proteins must be kept cold for optimal functioning, so that they are not

practicable in regions that lack cold chain systems. Other vaccination systems, such as those based on viral vectors, have the shortcoming that they may be inefficiently attenuated and may revert to a virulent strain (Hilleman R., 1995). Moreover, since they have to be incorporated in the host's genome they may cause undesirable mutations (Kurth R., 1995).

The technology of vaccination with nucleic acids relates to the method by which an immune response to a protein expressed "in vivo" is induced after the introduction of an oligonucleotide sequence that codes for this protein. This technology is radically different from the classical vaccines that contain the immunogenic material, either in the form of an inactivated pathogenic agent or more recently as a subunit of the pathogenic agent, either purified from the pathogen or produced by recombinant DNA or by chemical synthesis of peptides. The possibility of developing vaccines based on nucleic acids dates back to 1990 when Felgner and co-workers (Wolff et al., 1990) described how the injection of reporter genes in muscle cells resulted in the expression of the proteins encoded by the genetic material. Two years later Tang and co-workers (Tang et al., 1992) demonstrated that the immunization of animals with microspheres of colloidal gold covered with plasmid DNA led to the appearance of an immunogenic response in the animals to the proteins encoded by the injected DNA. Later on, Liu and co-workers

(Ulmer et al., 1993) demonstrated that the immunization of animals with DNA that encodes proteins of the influenza virus induced protective immunity to the pathogen. In these experiments, mice were immunized with plasmid DNA containing an insert encoding the proteins of the virus, which developed a humoral and cellular immune response that was sufficient to protect the animals from a lethal challenge with the influenza virus. Recently, several investigators have reported the efficacy of immunizations with DNA for inducing protective immune responses in animal models of several infectious diseases, some of which include intracellular pathogens like *P. salmonis*. These include influenza (Ulmer et al., 1993; Montgomery et al., 1993; Robinson et al., 1993), (Xiang et al., 1994), malaria (Sedegah et al., 1994; Hoffman et al., 1995), leishmaniasis (Xu and Liew, 1994), papilloma virus (Donnelly et al., 1995), herpes (McClements, 1995; Rouse, 1995), tuberculosis (Lozes E. et al.; Lowrie D. et al. 1997) and bovine herpes virus (Babiuk et al., 1995).

The nucleic acid vaccines can be based on RNA or on DNA, although the vast majority of the studies conducted in animals to date were based on DNA. Although messenger RNA is undoubtedly more attractive from the standpoint of the low possibility of integration in the genome, it does not appear to be the vehicle of choice owing to its instability and greater difficulty of production.

Two factors have to be taken into account when considering what type of tissue is best for immunizations with DNA vaccines, namely the level of antigen expressed and the accessibility of the antigen to the immune system. The amount of antigen produced will depend on the amount of DNA incorporated in the cells, which in its turn depends on the type of cells and on the formulation of the DNA. The level of expression will depend partly on the activity or potency of the promoter and on other genetic elements that optimize the transcription and translation occurring in the vector. For one and the same promoter, this activity can vary in different tissues. The expression vectors possess an efficient promoter, which are usually viral promoters such as those of the human cytomegalovirus, simian virus 40 (SV40), Rous sarcoma virus (RSV). These promoters are not tissue-specific, they have constitutive expression, and can be replaced by species- and tissue-specific promoter/enhancer elements as is the case with the β -actin gene of the carp *Cyprinus carpio* (Liu Z. et al., 1990). Moreover, from a region that contains sequences for multiple cleavage with various restriction enzymes, the vectors possess a polyadenylation site, for increasing the stability of the mRNA. The polyadenylation sequence of the bovine growth hormone gene, BGHpA, is usually employed for this purpose (Donnelly J., et al., 1997). They must also possess a prokaryotic replication origin, for efficient propagation of

the plasmid in competent *E. coli* cells. The commonest selection markers carried by the plasmid expression vectors used in DNA vaccines are ampicillin or kanamycin. It was found experimentally that if an intron (noncoding sequence) is inserted between the promoter region and the polyadenylation sequence, the efficiency of expression of the vector is increased by several times (Barry M., and Johnston S., 1977).

The accessibility of the antigen to the immune system is another important variable that will depend on its presentation. To induce a humoral type of response, the antigen will have to be presented on the surface of the cell transfected with the DNA or secreted and processed by antigen presenting cells, which will depend on the type of vector used. To induce a cellular response, it will be necessary to induce suitable presentation of peptides derived from the antigen by molecules encoded by the MHC of the host system (Donnelly J., et al., 1997), (Sewell A., et al., 1999; Whitton J., et al., 1999).

The transfer of nucleic acids to the vaccinated animal or individual can be carried out in various ways. The formulation most commonly used is the transfer of plasmid DNA or of DNA contained in a viral vector (adenovirus, retrovirus, vaccinia, herpes, etc.). Plasmid DNA offers several potential advantages as it is very stable and easier to prepare reproducibly. Moreover, in contrast to viral

vectors, plasmid DNA is usually designed to remain in episomal form, i.e. without the capacity for being integrated into the genome of the animal. Many of the viral vectors generally require integration in the genome, which might lead to activation of oncogenes or inactivation of tumor suppressor genes (Nichols et al., 1995). One of the most studied routes of immunization with DNA is direct injection of genetic material into muscular tissue. For example, Davis and co-workers (Davis et al., 1993) demonstrated that a single injection of DNA encoding the surface antigen of the hepatitis B virus, in mouse skeletal muscle, induces a rapid, potent and sustained humoral and cellular immune response. Despite the low efficiency of genetic transfer in mature muscle, it is sufficient for the purposes of immunization. For example, injection of just 10 micrograms of DNA in the mouse anterior tibial muscle induces antibodies at a level above 10 mIU/mL, a level that is considered sufficient for conferring protective immunity in humans (Davis H., et al., 1993). It was observed that the potency of the immunologic response is clearly related to the dose of the vaccine and the efficiency of transfection. Thus, methods that improve the incorporation of DNA in the cells improve the immunologic response. For example, injection of DNA in 25% sucrose gives a hundredfold increase in the level of antibodies (Davis et al., 1993). These authors also demonstrated that the immune response obtained as a result of immunization with DNA is

persistent, demonstrating that the level of antibodies obtained is maintained for at least 17 weeks after a single injection of DNA.

A very interesting technological variant was described recently by Barry and co-workers (Barry et al., 1995). These authors developed a method for the production of DNA vaccines based on immunization with expression libraries, which potentially encode all the proteins of the infectious agent. This makes it possible to develop vaccines even against pathogens for which very few protective antigens are known, since it is not necessary to know what genes of the pathogen are associated with immunity. Barry and co-workers demonstrated that immunization of mice with expression libraries obtained from complete genomic DNA of *Mycoplasma pulmonis*, a natural pathogen of rodents, was able to develop immunoprotection against challenge with the pathogen. This technology is based on the fact that all the antigens of the pathogen are finally encoded in its genome. Accordingly, the method involves making an expression library of the genome of the pathogen in suitable vectors that permit expression of the potential antigenic genes or of a proportion of them that it has been possible to clone. This genome can then be reduced in successive stages of fractionation until individual protective plasmids are obtained. As a result, this approach also makes it possible to discover individual candidate genes and use them as recombinant vaccines. The

critical aspect in the application of immunization with expression libraries is its sensitivity. For example, to cover the genome of a bacterial pathogen of 3×10^6 bp in 500 bp fragments would require approximately 6000 clones. However, only 1/6 of these would be in the correct frame and direction. Therefore one equivalent of expression would require 36 000 clones. Finally, it is important to point out that in fish (Kanellos et al., 1999) and specifically in carp (*Cyprinus carpio*), in trout (*Oncorhynchus mykiss*) and in goldfish (*Carassius auratus* L.), methodology has been described for expressing exogenous genes injected intramuscularly (Hansen et al., 1991; Anderson et al., 1996a and Russell et al., 1998, respectively). In the second case, moreover, Anderson's group demonstrated that trout injected in the skeletal musculature with a plasmid that contains the genes that code for proteins of the infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) and that are under the control of a cytomegalovirus promoter produce neutralizing antibodies that confer protection on the trout when challenged with IHNV (Anderson et al., 1996b).

Herrmann et al. (United States Patent 6,165,993) describe a concrete application of DNA vaccines for inducing an immune response to rotaviruses in various vertebrates.

For the particular case of the application of DNA vaccines against rickettsial diseases, Barbet et al. (United States Patent 6,025,338) disclosed a composition comprising

an isolated polynucleotide, which is able to induce an immune response to a disease caused by a pathogenic rickettsia, including *Cowdria ruminantium*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma marginale*.

Davis's patent (United States Patent 6,180,614) describes the general use of DNA vaccines as a method of immunization of aquaculture species. This patent also discloses the methods of administration of the DNA expression systems to the fish. Said methods include the techniques of injection, spraying and dipping.

HEAT STRESS PROTEINS AND THE IMMUNE RESPONSE

The heat stress proteins (HSPs) are molecules of conserved structure that play an important role within the cell. The HSPs are responsible for making possible the folding, unfolding and correct assembly of proteins, including the maturation of multimeric protein complexes, such as those of the immunoglobulins and MHC. Their participation in the processes of translocation of proteins between different cellular compartments has also been verified. It appears that these proteins play a role in protection and pathogenesis in various infections and autoimmune diseases. During episodes of stress, the synthesis of HSPs increases dramatically, and represents one of the most important mechanisms for survival of the cell. It has

been demonstrated that these proteins represent dominant antigens in a great many infectious episodes, inducing important humoral and cellular immunologic responses.

On penetrating to the intracellular milieu of a host cell, a microorganism encounters a number of stressful changes. Under these conditions, the synthesis of the microbial HSPs increases significantly, increasing the potential for survival. As a consequence, the HSPs are the main antigens that induce a strong immune response in various infectious diseases. There is a high degree of sequence homology of the HSPs between microorganisms of very variable virulence. The possible advantage for the immune system of focusing on the conserved sequences of the HSPs shared by several different microorganisms is the possibility of quickly mounting a broad immunologic response, reducing the risk of colonization of the host by the pathogen.

The nomenclature of the HSPs has been designed so that the molecular weight of the protein identifies it as belonging to a group, varying in size from the HSP10 family to the HSP100 family, the latter mainly in eukaryotes.

Different members of the HSP family represent targets for the immune response, HSP60 being the principal antigen in bacterial infections. For example, in the case of mycobacteria, in leprosy and tuberculosis the immune response to HSP60 predominates over the other HSPs. In contrast, a response directed against HSP70 has been found in humans

infected with parasites such as malaria, leishmaniasis, filariasis and candidiasis.

HSP16 and HSP10 are chaperones that bind to polypeptides recently synthesized in the ribosomes, to proteins that pass through the membranes of organelles and to proteins that have been denatured. This binding performs a protective role and prevents the proteins reaching an irreversible state of aggregation. Without denying that the chaperones intervene directly in protein folding, in the majority of cases it appears that they transport the denatured polypeptides to the chaperonin family of proteins that share homology in their amino acid sequence, and their molecular weight is around 60 kDa.

Both participate in the response to stress or response to heat shock, permitting adaptation to extreme environments, activating innate defense mechanisms and, on a second front, acquired defense mechanisms, by stimulating the production of antibodies and T lymphocytes (Zügel et al., 1999b).

The HSP10s, also described as GroEs of *E. coli*, are constituted of a heptamer of the protein of the same name. In the presence of GroEL (HSP60) and a nucleotide (ATP, ADP or even a nonhydrolyzable analog of ATP), the oligomer binds to GroEL and blocks the cavity of one of its rings permitting functionality of the GroEL-GroES-ATP complex, which: Inhibits aggregation of the partially folded polypeptides released

from the ribosomes, binds to partially folded peptides although trapped in a conformation such that they cannot fold spontaneously, and protects the proteins from denaturation. To summarize, this complex facilitates correct folding of denatured proteins.

The HSP16s are induced by conditions of stress in nematodes such as *Caenorhabditis elegans* (Yanes et al., 1999) and bacteria such as *Mycobacterium bovis* (Rhodes et al., 2000) and *Helicobacter pylori* (Ferrero et al., 1995; Kansau et al., 1996) and fulfil functions similar to the HSP10s.

HSP10 and 16 were selected as candidates for antigens, in addition to the characteristics mentioned previously, by the high sequence homology and presence of highly conserved antigenic domains that have proved to be good immunogens (Mats et al., 1997), and by the effective humoral and cellular response produced in mice after immunization with various antigens, for example: The antigens of *Escherichia coli* corresponding to HSP60, 10 and 15 (Zügel et al., 1999a and 1999b); *Mycobacterium leprae* HSP65, 10 and 18 (Mehra et al., 1992; Thole et al., 1995); *Helicobacter pylori* with the GroEs-GroEL complex (HSP60-HSP10) (Kansau et al., 1996; Ferrero et al., 1995); *Mycobacterium bovis* HSP16 (Rhodes et al., 2000). Lastly, as specific antigens of tumors, they permitted the generation of an immune response to various types of tumors (Raquena et al., 1997).

Vaccination with HSP

Protection induced by vaccination with HSP has been demonstrated in various animal models. For example, immunization of mice with HSP60 from *Helicobacter pylori*, *Histoplasma capsulatum* or *Yersinia enterocolitica* induces very significant protection for each of the respective pathogens. Furthermore, immunization of mice with HSP60 from mycobacterium, administered as protein or DNA, induces a strong response of T cells, *in vivo*, and significant protection against infection by *Mycoplasma tuberculosis*. Similarly, HSP70 from *M. tuberculosis* injected as DNA in mice induces considerable protection against tuberculosis, an intracellular pathogen.

The recent patents of Srivastava (US patents 6,168,793 and 6,143,299) must also be considered as publication of prior art. These documents disclosed the use of preparations of heat stress proteins for the prevention and treatment of cancer and of infectious diseases.

Definition of the problem solved by the invention

There is now a growing need for vaccines for mass infections of aquaculture species. As already explained, the vaccines currently on the market, based on bacterins, are of limited use and there is scant documentation concerning their

efficacy. Moreover, the production of bacterins for SRS is very expensive, owing to the complexity of the cultivation system. The present invention solves the problems of the prior art, applying the latest findings of molecular biology, for producing DNA vaccines and recombinant vaccines against SRS. It makes it possible to produce these vaccines on a large scale and very efficiently, being independent of the complex cultivation systems required for the proliferation of *Piscirickettsia salmonis*.

Definition of the invention

The invention relates generally to a DNA vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, especially in aquaculture species, such as the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout, based on a DNA fragment that codes for the heat stress protein 10 (HSP10), and the method of preparation thereof. The invention also describes a purified oligonucleotide to be used for the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates and a recombinant vaccine prepared starting from this oligonucleotide.

The term "vaccine" refers here to any material capable of inducing an immune response in the animal that has received said material.

Vaccination with nucleic acids relates to the method by which an immune response to a protein expressed "in vivo" is induced after the introduction of an oligonucleotide sequence that codes for this protein. Therefore, the concept of "DNA vaccine", as used here, refers to any DNA segment that, when introduced into an animal, produces the immune response explained in the preceding sentence.

The main object of the present invention is a DNA vaccine that comprises a DNA fragment that codes for the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof, inserted in a suitable plasmid vector for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

In a preferred embodiment of this invention, said DNA fragment corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 (see Fig. 1) or a fragment thereof. Alternatively, said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the heat stress protein 10 of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 (see Fig. 2) or an immunogenic region thereof.

In another preferred embodiment of the DNA vaccine according to the invention, the suitable plasmid vector has

the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker. Preferably, said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2.

In particular, said vertebrate corresponds to an aquaculture species, and preferably it is the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout.

In another preferred embodiment of the DNA vaccine according to the invention, it is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying and dipping. Moreover, the vaccine contains a suitable adjuvant and/or a pharmaceutically acceptable carrier.

In another variant of the present invention, the presence of antibodies to HSP10 generated by the DNA vaccine is detected by a method according to which, after a time, blood is taken from the vertebrate that was vaccinated and the serum is analyzed for the presence of antibodies to HSP10 by ELISA.

A second main object of the invention is a method of preparation of the DNA vaccine against *Piscirickettsia salmonis* that comprises the following stages:

- a) Cloning the DNA fragment that codes for the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof
- b) Inserting it in a suitable plasmid vector for its expression and generation of an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

In a preferred embodiment, the method comprises a DNA fragment that corresponds to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof. Alternatively, the DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the heat stress protein 10 of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 (see Fig. 2) or an immunogenic region thereof.

In another preferred embodiment, the method comprises the suitable plasmid vector that has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker. Preferably, said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2.

In particular, the vertebrate corresponds to an aquaculture species, and preferably it is the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout.

In another preferred embodiment of the method according to the invention, the vaccine is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying and dipping.

A third main object of the invention is a purified DNA segment to be used for the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, that codes for the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof. In a preferred embodiment of this invention, the DNA segment has the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 (see Fig. 1) or a fragment thereof. Alternatively, the DNA segment has a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated. For both embodiments, it has been established that the heat stress protein 10 of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 (see Fig. 2) or an immunogenic region thereof.

In particular, the vertebrate corresponds to an aquaculture species, preferably the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout.

In another embodiment of the present invention, the oligonucleotide is used for producing a recombinant vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, where the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof is produced using a suitable expression vector and a suitable host. In particular, the vertebrate corresponds to an aquaculture species, preferably the Coho salmon, the Atlantic salmon, the Chinook salmon or the trout. In another variant, the expression vector is a plasmid, preferably the vector pET32a. Moreover, it has been determined that the host is a bacterium, preferably *E. coli*.

In another preferred embodiment of the recombinant vaccine according to the invention, it is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying and dipping. Moreover, the vaccine contains a suitable adjuvant and/or a pharmaceutically acceptable carrier.

In another variant of the present invention, the presence of antibodies to HSP10 generated by the recombinant vaccine is detected by a method according to which, after a time, blood is taken from the vertebrate that was vaccinated and the serum is analyzed for the presence of antibodies to HSP10 by means of ELISA.

Description of the drawings

Fig. 1:

This diagram shows the nucleotide sequence (SEQ ID No. 1) of the gene that codes for the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis*.

Fig. 2:

This diagram shows the amino acid sequence (SEQ ID No. 2) of the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis*.

Fig. 3:

This diagram shows a schematic representation of the plasmid pUK21-A2.

Fig. 4:

This diagram shows a schematic representation of the plasmid pUK21-A2, containing the insert with the HSP10 gene, designated pUK21-A2 HSP10.

Fig. 5:

This diagram shows the structure of the plasmid pET-32a

Fig. 6:

This diagram shows the structure of the plasmid pET32a-HSP10

Fig. 7:

This diagram shows the production of HSP10 of *P. salmonis* in *E. coli*

EXAMPLES

The following examples illustrate some concrete applications of the invention, but are not intended to limit the scope of the present invention.

Example 1: Isolation, cloning and sequence of the HSP10 gene of *P. salmonis*

a) Culture of CHSE-214 cells

Inocula of CHSE-214 cells (ATCC 1681), stored in liquid nitrogen, were thawed and cultivated in T175 bottles in MEM medium at 16°C for 7 days or until the cells reached confluence.

b) Culture of *P. salmonis*.

Inocula of *P. salmonis* containing at least a titre of 1×10^8 bacteria/mL were used for each of the T175 bottles

with CHSE-214 cells. On the next day, the medium was withdrawn and 50 mL of fresh MEM-complete medium was added. Culture was carried out at 16°C for 10 to 14 days, periodically observing, with the phase contrast microscope, the degree of lysis of the CHSE-214 cells caused by the bacterial infection. When the cytopathic effect was in the region of 100% of the cells, the culture of *P. salmonis* was considered to be ready for harvesting or for subsequent propagation of the culture. The bacteria were harvested using a cell scraper. Once collected, the lysate was centrifuged and the supernatant collected corresponds to the semipurified fraction of *P. salmonis*.

c) Purification of *P. salmonis*

To purify the bacterium, the suspension with the semipurified fraction of *P. salmonis* was submitted to density gradient centrifugation, obtaining a major band near the bottom of the centrifuge tube. This band was collected and was washed two to three times by centrifugation with a buffer solution. The final sediment or pellet constitutes the purified fraction of *P. salmonis*.

d) Preparation of genomic DNA of *P. salmonis*

Our method is based on Binder's protocol (Binder, 1995, Mitochondrial nucleic acid purification and analysis. Methods in Molec. Biol. 20:1). Briefly, the purified fraction

of *P. salmonis* was washed with PBS buffer, 20 μ L of a solution of 10 mg/mL of DNase I was added to it, and it was incubated at 37°C for 30 min. After centrifugation to remove the supernatant, the pellet was resuspended in 500 μ L of PBS plus 100 μ L of 0.1M EDTA to stop the activity of the DNase I. It was agitated gently by inversion, centrifuged again and the pellet, without DNase I, was resuspended in 1 mL of lysis buffer (sucrose 0.75 M, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 0.2%, 1 mg of Proteinase K, pH 9). It was agitated gently by inversion and it was incubated at 58°C for 1 hour, with gentle agitation. On completion of incubation with the protease, the solution was extracted with one volume of phenol saturated with Tris-HCl (pH 8) and was then extracted twice with a 24:1 chloroform-isoamyl alcohol mixture. Next, the DNA was precipitated with 0.4 volumes of 5M ammonium acetate and 2.5 volumes of cold absolute ethanol at -20°C for 30 min.

e) Polymerase chain reaction (PCR)

Autoclaved 500 μ L Eppendorf tubes were filled with 5 μ L of PCR buffer 10 X without Mg, 1.5 μ L of MgCl₂ 50 mM, 4 μ L of dNTP mixture 2.5 mM, 2.5 μ L of each of the oligonucleotide primers (14.1 μ M of each), 100 ng of template DNA, 0.5 μ L of Taq DNA polymerase 5 U/ μ L, made up to a final volume of 50 μ L with milliQ sterile water. The experimental

conditions used were as stated by Mauel et al., 1996 (Diseases of Aquatic Organisms, 26:189).

f) Agarose gel electrophoresis

To determine the integrity of the genomic DNA of *P. salmonis*, as well as that of the plasmid DNA, and that of the amplification products, 1 and 2% agarose gel electrophoresis was performed. This method was carried out according to Sambrook et al., 1989 (Molecular cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York).

g) Cloning and sequencing of the hcp10 gene of the heat stress protein of *P. salmonis*.

Using algorithms for comparing the sequence homology of DNA (PCGene and National Center for Biotechnology Information), the localization of the most conserved sequences in the HSP10 gene of *Rickettsia* and of other bacteria whose genes of these proteins show homologies with *Rickettsia* was determined. In parallel, analyses of hydrophilicity of the HSPs of these species were performed to determine the regions of the protein where there are strong antigenic determinants. The regions of HSP10 of *P. salmonis* to be amplified by PCR were defined on the basis of this information.

On the basis of homologies with the genomes of other organisms, in particular *Legionella pneumophila* and

Coxiella burnetii, the primers a) sense and b) antisense were designed, and were used in a polymerase chain reaction, using highly purified chromosomal DNA of *P. salmonis* as template. This process gave rise to a fragment of approximately 290 base pairs that was cloned in the vector pGEMt. Once DNA of the resultant plasmid (pGEMt HSP10) was isolated, the insert was sequenced, demonstrating the presence of a gene that codes for a protein of 98 amino acids, which displays high homology with the HSP10 of other organisms as well as with the partial sequence of fragments of *P. salmonis* obtained previously.

The results are presented in Figs. 1 and 2. Fig. 1 shows the nucleotide sequence (SEQ ID No. 1) of the gene that codes for the heat stress protein 10 of *Piscirickettsia salmonis* (HSP10). Fig. 2 shows the amino acid sequence (SEQ ID No. 2) of the heat stress protein 10 of *Piscirickettsia salmonis*.

Example 2: Preparation of a vector for a genetic vaccine. Cloning of the HSP10 gene of *P. salmonis* in the plasmid pUK21-A2.

The vector pUK21-A2 possesses the following characteristics necessary for use as DNA vaccine: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the

transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

a) Preparation of DNA of the plasmid pUK21-A2

Plasmid DNA obtained from *E. coli* HB 101 was purified using the commercial kit Qiagen Plasmid Purification (Qiagen) in accordance with the supplier's instructions. The plasmid was linearized with the enzyme EcoRI, then the ends were repaired with DNA polymerase, according to the protocols of Sambrook et al., 1989 (Molecular cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York). Next, the ends of the linearized vector were dephosphorylated by adding 15 μ L of alkaline phosphatase (1 U/ μ L), then incubating for 1 hour at 37°C. Finally the plasmid DNA prepared was purified using the "Wizard" system (Promega, Madison, Wisconsin, USA). Fig. 3 shows a schematic representation of the plasmid pUK21-A2.

b) Cloning of the HSP10 gene of *P. salmonis* in the vector pUK21-A2.

For preparation of a vector for a genetic vaccine, 2 new primers are designed, which include the initial and final sequences of the HSP10 gene of *P. salmonis* as well as the sequences of specific sites for restriction endonucleases BamHI and EcoRI.

These primers are a) sense and b) antisense:

Using these primers, a polymerase chain reaction is carried out using highly purified chromosomal DNA of *P. salmonis* (the same as that described in Example 1) as template. As a result, a fragment of approximately 1920 base pairs is obtained. This fragment is isolated, and after digestion with the endonucleases BamHI and EcoRI it is joined to the plasmid pUK21-A2, generating the vaccine vector pUK21-A2-HSP10. Fig. 4 shows a schematic representation of the plasmid containing the HSP10 insert.

Example 3: Development of antibodies in mice after intramuscular injection of the plasmid pUK21-A2-HSP10.

The plasmid that contains the HSP gene in an animal expression vector, designated pUK21A2-HSP10, after injection in mouse muscle is capable of expressing this protein and developing an immune response that gives rise to the appearance of antibodies. This is demonstrated as follows. A solution of each of the plasmids is prepared in PBS buffer at a DNA concentration of 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Mice belonging to the Balb/c strain are injected in the femoral muscle of the hind limbs with 2 doses of 100 μl of a solution of 50 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ of plasmid DNA (50 μl is injected in each limb). This injection is performed on day zero and a second dose is administered at 15 days (day 15). As control, the same operation is carried

out using control plasmid DNA that does not possess the HSP10 gene (pUK21-A2).

After 45 days have passed (day 45), blood is taken from the mice and the serum is analyzed for the presence of antibodies to HSP10 by ELISA.

a) Determination of anti-HSP10 antibodies by ELISA

The mice immunized on days 0 and 15 with the plasmids pUK21A2 and pUK21A2-HSP10 are bled on day 45, with a cut in the inferior caudal vein of the tail. The 250 μ l of blood obtained is incubated at 37°C for one hour to obtain the serum. The same procedure of bleeding and obtaining the serum is also performed before immunization. This sample is called pre-immune serum.

The humoral immune response of the immunized mice with the plasmids is evaluated by ELISA, as described below.

1. 96-well polystyrene plates, treated beforehand with a bioadhesive phenolic protein (Pegotin), are activated with 10 μ g/ml of antigen, 50 μ l/well. They are incubated for 90 min at room temperature.
2. The antigen is removed and the nonspecific sites are blocked with a 4% solution of casein sucrose, 300 μ l/well for 60 min at room temperature.

3. 50 μ l of a serial dilution of the serum from the immunized mice and pre-immune serum is added to each well. It is incubated for 90 min at room temperature.
4. The serum samples are removed and the plate is washed with 300 μ l/well of phosphate saline buffer, containing Tween 20 at 0.02%. This is done 3 times, with intervals of 5 min between each washing cycle.
5. The solution from the last washing is removed and 50 μ l of mouse anti- immunoglobulin G goat antibody, combined with alkaline phosphatase, at the dilution recommended by the manufacturer in blocking solution, is added to each well. It is incubated for 30 min at room temperature, then proceeding as in point 4.
6. The solution from the last washing is removed and 50 μ l of a solution containing 1 mg/ml of paranitrophenyl phosphate in Tris 100 mM buffer, sodium chloride 100 mM and magnesium chloride 5 mM (pH 9.5) is added to each well. It is incubated for 30 minutes at 37°C.
7. The reaction is stopped with 3M sodium hydroxide and spectrophotometer readings are taken at a wavelength of 405 nm.

As shown by the results in Table 1, the serum from the mice injected with the plasmid pUK21A2-HSP10 reacts with the HSP10 protein in ELISA, indicating that it contains specific antibodies to this protein. In contrast, the mice injected with a control preparation (pUK21A2) do not develop

antibodies to HSP10. This example shows that by injecting genes of HSP10, prepared as described in this invention, it is possible to stimulate the immune system of the mouse and develop a humoral response in the form of anti-HSP10 antibodies.

Table I. Measurement of anti-HSP10 antibodies in mice immunized with pUK21A2-HSP10.

Sample	O.D. reading 445 nm/30 min	
Preimmune serum	0.02	
Serum from mouse immunized with pUK21A2 (control)	0.04 *	
Serum from mouse immunized with pUK21A2-HSP10	0.25 *	

* Mean value for 4 different mice.

Example 4: Production of the recombinant protein HSP10 by cloning of the HSP10 gene in the bacterial expression vector pET32a and its subsequent purification

After confirming the sequence of the HSP10 gene, the latter is amplified by PCR from genomic DNA using sense and antisense primers having at their ends the restriction sites EcoRI and XhoI, respectively. These oligos are sense: 5'-TATGAATTCATGGCTGAAATTATTGGTATTG-3' and antisense 5'-GTACTCGAGCTAAACTTCTTCAAACCTCAGCATC-3'. The amplified fragment

is cloned in the vector pGEMT and the positive clones are identified by PCR and enzymatic digestion. The HSP10 gene is isolated from the clone pGEMT-HSP10, by means of the enzymes EcoRI and XhoI and is purified by agarose gel electrophoresis. The purified gene is ligated using T4 phage ligase to the vector pET32a (Fig. 5) cut with XhoI and EcoRI. The positive clones are identified by digestion with these enzymes. Fig. 6 shows the structure of the resultant plasmid pET32a-HSP10, which expresses a fusion protein composed of HSP10 and a segment that contains polyhistidine used for its purification. Plasmid DNA was obtained from one of the recombinant clones and was used for transforming competent cells of *E. coli*. Expression of the fusion protein Trx-HSP10 is induced in a culture of recombinant cells by the action of 1 mM IPTG. The protein present in the bacterial supernatant is purified on an Ni-agarose column. All the procedures were performed in accordance with the protocols described by Sambrook (Sambrook et al., 1989).

Fig. 7 shows a polyacrylamide gel with SDS made according to Laemmli, which shows the production of the fusion protein Trx-HSP10 by recombinant bacteria transformed with the plasmid pET32a-HSP10.

PATENT CLAIMS

1. A DNA vaccine, which comprises a DNA fragment corresponding to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof that codes for the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof, inserted in a suitable plasmid vector for expressing the protein and generating an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

2. The DNA vaccine as claimed in claim 1, wherein said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated.

3. The DNA vaccine as claimed in claim 1, wherein said heat stress protein 10 from *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 or an immunogenic region thereof.

4. The DNA vaccine as claimed in claims 1 to 3, wherein said suitable plasmid vector has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

5. The DNA vaccine as claimed in claim 4, wherein said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2 or some other with similar characteristics.

6. The DNA vaccine as claimed in claims 1 to 4, wherein said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

7. The DNA vaccine as claimed in claim 5, wherein said aquaculture species is the Coho salmon.

8. The DNA vaccine as claimed in claim 5, wherein said aquaculture species is the Atlantic salmon.

9. The DNA vaccine as claimed in claim 5, wherein said aquaculture species is the Chinook salmon.

10. The DNA vaccine as claimed in claim 5, wherein said aquaculture species is the trout.

11. The DNA vaccine as claimed in claims 1 to 10, wherein said vaccine is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying or dipping.

12. The DNA vaccine as claimed in claims 1 to 11, wherein said vaccine additionally includes a suitable adjuvant.

13. The DNA vaccine as claimed in claims 1 to 12, wherein said vaccine additionally includes a pharmaceutically acceptable carrier.

14. A method of detecting the presence of antibodies to HSP10 generated by the DNA vaccine as claimed in claims 1 to

13, wherein after a time blood is taken from the vaccinated vertebrate and the serum is analyzed for the presence of antibodies to HSP10 by ELISA or some other method known in the prior art for the detection of antibodies.

15. A method of preparation of the DNA vaccine against *Piscirickettsia salmonis*, which comprises the following stages:

a) Cloning the DNA fragment corresponding to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof that codes for the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof.

b) Inserting it in a suitable plasmid vector for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

16. The method as claimed in claim 15, wherein said DNA fragment corresponds to a nucleotide sequence that gives rise to the same protein or protein fragment as SEQ ID No. 1, using various codons, preferably the codons most used by the vertebrate organism that is to be vaccinated.

17. The method as claimed in claim 15, wherein said heat stress protein 10 of *Piscirickettsia salmonis* corresponds to the amino acid sequence SEQ ID No. 2 or an immunogenic region thereof.

18. The method as claimed in claims 15 to 17, wherein said suitable plasmid vector has the following characteristics: a) a strong promoter, usually of the viral type that is not tissue-specific; b) a cloning site for

insertion of the gene of interest; c) a polyadenylation site for stopping the transcription of the messenger RNA; d) a prokaryotic replication origin for efficient propagation in cultures of *E. coli*; and e) a selection marker.

19. The method as claimed in claim 18, wherein said plasmid vector is the plasmid pUK21-A2 or some other with similar characteristics.

20. The method as claimed in claims 15 to 19, wherein said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

21. The method as claimed in claim 20, wherein said aquaculture species is the Coho salmon.

22. The method as claimed in claim 20, wherein said aquaculture species is the Atlantic salmon.

23. The method as claimed in claim 20, wherein said aquaculture species is the Chinook salmon.

24. The method as claimed in claim 20, wherein said aquaculture species is the trout.

25. A purified DNA segment to be used for the production of a vaccine against *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates, wherein said DNA segment, corresponding to the nucleotide sequence SEQ ID No. 1 or a fragment thereof, codes for the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof.

26. The purified DNA segment as claimed in claim 25, wherein it corresponds to a nucleotide sequence equivalent to

SEQ ID No. 1, in accordance with the genetic code or a fragment thereof.

27. The use of the purified DNA segment as claimed in claims 25 to 26, wherein it is used for preparing a medicinal product that can be used for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates.

28. The use of the purified DNA segment as claimed in claim 27, wherein said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

29. The use of the purified DNA segment as claimed in claim 28, wherein said aquaculture species is the Coho salmon.

30. The use of the purified DNA segment as claimed in claim 28, wherein said aquaculture species is the Atlantic salmon.

31. The use of the purified DNA segment as claimed in claim 28, wherein said aquaculture species is the Chinook salmon.

32. The use of the purified DNA segment as claimed in claim 28, wherein said aquaculture species is the trout.

33. A recombinant vaccine for inducing an immune response to *Piscirickettsia salmonis* in vertebrates produced using the DNA segment as claimed in claims 28 to 30, wherein the heat stress protein 10 (HSP10) of *Piscirickettsia salmonis* or an immunogenic region thereof is produced using a suitable expression vector and a suitable host.

34. The recombinant vaccine as claimed in claim 33, wherein said vertebrate corresponds to an aquaculture species.

35. The recombinant vaccine as claimed in claim 34, wherein said aquaculture species is the Coho salmon.

36. The recombinant vaccine as claimed in claim 34, wherein said aquaculture species is the Atlantic salmon.

37. The recombinant vaccine as claimed in claim 34, wherein said aquaculture species is the Chinook salmon.

38. The recombinant vaccine as claimed in claim 34, wherein said aquaculture species is the trout.

39. The recombinant vaccine as claimed in claims 33 to 38, wherein said expression vector is a plasmid or other DNA construct capable of expressing the HSP10 protein or a fusion protein containing it, in a suitable host.

40. The recombinant vaccine as claimed in claim 39, wherein said plasmid is preferably the vector pET32a.

41. The recombinant vaccine as claimed in claims 33 to 40, wherein said host is a microorganism, an insect cell or an animal cell.

42. The recombinant vaccine as claimed in claim 41, wherein said host is preferably *E. coli*.

43. The recombinant vaccine as claimed in claims 33 to 42, wherein said vaccine is administered by suitable techniques, selected from the group comprising intramuscular injection, spraying and dipping.

44. The recombinant vaccine as claimed in claims 33 to 42, wherein said vaccine additionally includes a suitable adjuvant.


45. The DNA vaccine as claimed in claims 33 to 44, wherein said vaccine additionally includes a pharmaceutically acceptable carrier.

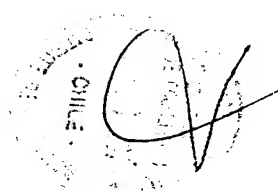
46. A method for detecting the presence of antibodies to HSP10 generated by the recombinant vaccine as claimed in claims 35 to 45, wherein after a time blood is taken from the vaccinated vertebrate and the serum is analyzed for the presence of antibodies to HSP10 by ELISA or some other method known in the prior art for the detection of antibodies.

ORIGINAL

INSTRUCCIONES:

- 1.- LLENE SOLAMENTE LOS RECUADROS DE TONO ROSADO CON CARACTERES NEGROS DE MAQUINA (NO MANUSCRITO)
2.- SE ENTENDE POR PRIORIDAD AQUELLA PROTECCION SOLICITADA O CONCEDIDA ANTERIORMENTE POR EL MISMO INVENTO, GENERALMENTE EN EL EXTRANJERO

22 FECHA DE SOLICITUD DIA MES AÑO		 REPUBLICA DE CHILE MINISTERIO DE ECONOMIA FOMENTO Y RECONSTRUCCION SUBSECRETARIA DE ECONOMIA DEPTO. PROPIEDAD INDUSTRIAL	11 NUMERO DE PRIVILEGIO
41 DIA MES AÑO			21 NUMERO DE SOLICITUD 0111 - 2007
12 TIPO DE SOLICITUD		PRIORIDAD: TIPO <input type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> PATENTE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL 31 N°: 33 PAÍS: 32 FECHA:	ESTADO <input type="checkbox"/> CONCEDIDA <input type="checkbox"/> EN TRAMITE
<input checked="" type="checkbox"/> PATENTE DE INVENCIÓN <input type="checkbox"/> PATENTE DE PRECAUCIONAL <input type="checkbox"/> MODELO DE UTILIDAD <input type="checkbox"/> DISEÑO INDUSTRIAL <input type="checkbox"/> TRANSFERENCIA <input type="checkbox"/> CAMBIO DE NOMBRE <input type="checkbox"/> LICENCIA		DOCUMENTOS ACOMPAÑADOS <input checked="" type="checkbox"/> RESUMEN <input checked="" type="checkbox"/> MEMORIA DESCRIPTIVA <input checked="" type="checkbox"/> PLIEGO DE REIVINDICACIONES <input checked="" type="checkbox"/> DIBUJOS <input type="checkbox"/> PODER <input type="checkbox"/> CESION <input type="checkbox"/> COPIA PRIORIDAD <input type="checkbox"/> PROTOTIPO <input type="checkbox"/> CERTIFICADA <input type="checkbox"/> TRADUCIDA AL ESPAÑOL	
TITULO O MATERIA DE LA SOLICITUD "VACUNA CONTRA LA INFECCION POR PISCIRICKETTSIA SALMONIS BASADA EN UN FRAGMENTO DE ADN (GEN DE HSP10) QUE CODIFICA PARA LA PROTEINA DE ESTRES TERMICO 10 DE PISCIRICKETTSIA SALMONIS O UNA REGION INMUNOGENICA DE ESTA"			
71 SOLICITANTE(S): (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, PAIS, TELEFONO) FUNDACION CIENCIA PARA LA VIDA AV. MARATHON 1943, ÑUÑO A; SANTIAGO; CHILE Y FUNDACION CHILE AV. PARQUE ANTONIO RABAT SUR 6165, VITACURA, SANTIAGO, CHILE			
72 INVENTOR O CREADOR: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - NACIONALIDAD) VALENZUELA, VALDES, Pablo; BURZIO, ERIZ, Luis; ROSEMBLATT, SILBER, Mario - CHILENOS			
74 REPRESENTANTE: (APELLIDO PATERNO, APELLIDO MATERNO, NOMBRES - CALLE, COMUNA, CIUDAD, TELEFONO) BIOTECNOLOGIAS DEL AGUA LTDA. y/o DAVOR GOTORAS y/o PABLA VIEDMA ANIBAL ARACENA 571, ÑUÑO A, SANTIAGO, CHILE, TEL. 2393822 RAUL LLOVET A. WIS THAYER ORDA 073, Of. 602, SANTIAGO			
DECLARO/ DECLARAMOS QUE LOS DATOS QUE APARECEN EN LOS RECUADROS DE TONO ROSADO SON VERDADEROS Y TAMBIEN CONOCER EL ART. 44 DE LA LEY N° 19.039 SOBRE PROPIEDAD INDUSTRIAL Y QUE EL PRESENTE DOCUMENTO CONSTITUYE UNA SOLICITUD FORMAL.		RECEPCION	
78.365.180-7 FIRMA Y R.U.T. REPRESENTANTE		FIRMA Y R.U.T. SOLICITANTE	





(19) REPUBLICA DE CHILE
MINISTERIO DE ECONOMIA
FOMENTO Y RECONSTRUCCION
SUBSECRETARIA DE ECONOMIA



DEPARTAMENTO DE PROPIEDAD INDUSTRIAL

(11) N° REGISTRO

(12) TIPO DE SOLICITUD:



INVENCIÓN



MODELO DE UTILIDAD



PRECAUCIONAL



MEJORA



REVALIDA

(43) Fecha de Publicación:

(51) Int. Cl. °:

(21) Número de Solicitud:

(22) Fecha de Solicitud:

(30) Número de Prioridad: (país, n° y fecha)

(72) Nombre Inventor(es): (incluir dirección)

(71) Nombre Solicitante: (Incluir dirección y tel.)

FUNDACION CIENCIA PARA LA VIDA
Av. Marathon 1943, Ñuñoa, Santiago, Chile
FUNDACION CHILE, Av. Parque Antonio
Rabat Sur 6165, Vitacura, Santiago, Chile

VALENZUELA, VALDÉS, Pablo; BURZIO, ERIZ,
Luis y ROSEMBLATT, SILBER, Mario, Chilenos.
Av. Marathon 1943, Ñuñoa, Santiago, Chile

(74) Representante: (Incluir dirección y teléfono)

Biotecnologías del Agua Ltda. y/o Davor Cotoras y/o
Pabla Viedma, Aníbal Aracena 571, Ñuñoa, Chile
Tel. 2393822

(54) Título de la Invención: (máximo 330 caracteres)

Vacuna contra la infección por *Piscirickettsia salmonis* basada en un fragmento de ADN (gen de HSP10) que codifica para la proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta.

(57) Resumen: (máximo 1600 caracteres)

Una vacuna de ADN para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, especialmente en especies de acuicultura, tales como el salmón coho (*Oncorhynchus kitsuch*), el salmón del Atlántico (*Salmo salar*), el salmón chinook (*O. tshawytscha*) o la trucha (*O. mykiss*), basada en un fragmento de ADN que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10). El procedimiento de preparación de esta vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, que comprende las siguientes etapas: a) Clonar el fragmento de ADN que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta. b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

La invención también describe la utilización de este fragmento de ADN en la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados y una vacuna basada en una proteína recombinante preparada a partir de este fragmento.



MEMORIA DESCRIPTIVA

Campo de la invención.-

La presente invención se refiere a una vacuna de ADN para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, especialmente en especies de acuicultura, tales como el salmón coho, el salmón del Atlántico, el salmón Chinook o la trucha, basada en un fragmento de ADN que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10), y su procedimiento de preparación. La invención también describe un segmento de ADN útil en la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados y una vacuna basada en una proteína recombinante preparada a partir de este oligonucleótido

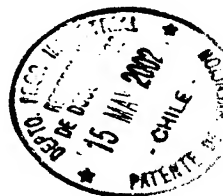
ANTECEDENTES

Descripción de lo conocido en la materia

SÍNDROME RICKETTSIAL DEL SALMON (SRS)

La bacteria intracelular *Piscirickettsia salmonis*, causante de la enfermedad llamada Síndrome Rickettsial del Salmon (SRS), ha sido desde un poco antes de su identificación (Fryer y col., 1990) un creciente problema para la industria salmonera chilena. Lo que inicialmente se describía como una patología que afectaba sólo al salmón coho, se extendió a la trucha y al salmón del Atlántico. Pero, no solamente la extensión de la enfermedad a las otras especies salmónidas cultivadas en el país fue la causa del empeoramiento de la situación, sino que durante la década pasada esta enfermedad fue adquiriendo más fuerza y año tras año, las mortalidades relacionadas a ella, los costos en tratamiento y, los efectos en la productividad y en la calidad del producto final han aumentado.

Las medidas de mitigación de la enfermedad utilizadas en los centros de cultivo hoy en día están basadas principalmente en el tratamientos con antibióticos y otras

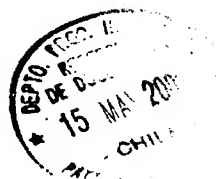


medidas de manejo tales como la aplicación de periodos de descanso entre ciclos productivos, para así evitar la transmisión horizontal, en el uso de algunos inmunoestimulantes disponibles en el mercado, y en la limitación de la transmisión vertical, a través de costosos procedimientos de selección de reproductores. En ausencia de vacunas efectivas, las acciones enumeradas son las únicas armas que el acuicultor ha usado para limitar los efectos de la enfermedad.

Todos estos procedimientos no están totalmente desarrollados, ni totalmente incorporados a las metodologías de producción, y en algunos casos no son aplicados completamente o correctamente. Todo esto se suma a la aparición de cepas de *Piscirickettsia* de mayor virulencia, y la interacción con las otras enfermedades bacterianas, virales y parasitarias que se han ido agregando año a año a la lista de enfermedades con las que el acuicultor debe lidiar. Esto explica que la situación sólo haya ido empeorando a través de los años.

El Síndrome Rickettsial del Salmón sigue sin una solución sólida. Los tratamientos con antibióticos se están haciendo cada vez menos efectivos. Su aplicación exitosa es incierta y sólo hay respuesta cuando se aplican muy tempranamente y, en muchos casos, el suministro inyectable del antibiótico es la única solución factible. En el mediano plazo, la única solución viable será la utilización de vacunas para la inmunización de los peces, previo a su exposición a las condiciones de cultivo marino, donde la propagación horizontal de la enfermedad es muy eficiente, ya que la sobrevivencia de la bacteria en agua dulce es muy baja.

Las vacunas existentes en el mercado, consisten en bacterinas de uso restringido y con escasa documentación acerca de su efectividad. Además, la producción de bacterinas para SRS es de alto costo, debido a la complejidad del sistema de cultivo del patógeno. La producción in vitro de *Piscirickettsia*, una bacteria intracelular estricta, requiere la inoculación de la bacteria sobre un cultivo de la línea celular apropiada. El hecho de que estas bacterinas sean producidas en los sistemas complejos ya descritos, tiene efectos en el nivel de control sobre los antígenos producidos, así es posible que las bacterias cosechadas no contengan los antígenos o no los contengan en el nivel requerido para inducir la protección deseada. Una alternativa a las bacterinas es la producción dirigida de antígenos, a través de la



clonación de los genes que codifican los antígenos deseados del patógeno en una bacteria más simple de cultivar, para producir los antígenos. La producción de vacunas a través de esta técnica da origen a lo que se conoce como vacunas de ADN recombinante. Hay dos posibles presentaciones para este tipo de vacuna, la suspensión de células atenuadas en algún tipo de coadjuvante apropiado (generalmente de tipo oleoso), o la suspensión de los antígenos fraccionados a partir de la bacteria cultivada en un coadjuvante apropiado. En ambos casos es esperable tener algunos efectos secundarios post vacunación, que se manifiestan como una disminución del crecimiento durante unas semanas, posterior a la vacunación, y a ciertas adherencias peritoneales, que podrían afectar la calidad y/o el crecimiento de los peces. La última generación en vacunas son las de ADN, que consisten en la inyección de cantidades mínimas de material genético que codifique antígenos específicos del patógeno. De esta manera, el huésped comienza a producir *in-situ* los antígenos codificados. El material genético introducido tendrá una vida media de unos días, después de lo cual desaparece, tras cumplir su función.

ANÁLISIS DEL ESTADO DE LA TÉCNICA

VACUNAS EN ACUICULTURA, VACUNAS PARA SRS

Antecedentes generales

En la actualidad, la industria salmonera nacional se ha consolidado como una importante fuente de divisas para el país, generando empleo y permitiendo el surgimiento de otras empresas relacionadas con el sector. En 1998, la producción neta nacional de salmónes y truchas alcanzó un volumen de 181.600 toneladas, generando divisas por un monto de US\$ 713,5 millones (ver Salmonoticias N° 72; pág. 4-6; 1999). Sin embargo, esta actividad no ha estado exenta de problemas, a la acusación de dumping y a la brusca caída del mercado japonés, principal destino del salmón chileno, hay que sumar las pérdidas económicas que se producen debido a la muerte de los salmónes. La mortalidad de los salmónes en cautiverio se debe a diversos factores, entre los cuales se pueden mencionar la acción de la fauna depredadora, malos procedimientos sanitarios, y la alta densidad de peces por



jaulas. No obstante, son las enfermedades, y principalmente las causadas por agentes infecciosos, las que se destacan por provocar pérdidas masivas (ver Salmonoticias Nº 71; pág. 12-13 y Nº 72; pág 18-19; 1999). Actualmente los ejemplares producidos en Chile, se encuentran asediados principalmente por microorganismos tales como *Renibacterium salmoninarum*, agente causante de BKD (Bacterial Kidney Disease) y otro de naturaleza rickettsial como la *Piscirickettsia salmonis* que es el agente causante del síndrome rickettsial de salmonídeos, patología que sin duda ha provocado las mayores pérdidas a la industria salmonera en Chile. La cantidad de dinero que se pierde debido a esta enfermedad se ha evaluado en más de US\$ 100 millones anuales, si se incluyen tanto los costos directos en términos de mortalidades, tratamiento, alimentación, así como la pérdida de ganancias potenciales (Obach A., y cols., 1998). Otro agente infeccioso que está causando problemas en este sector es un virus perteneciente al género *Birnaviridae* conocido como Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) (Bruno D., y Poppe T., 1996). Este virus posee un ARN de doble hebra y que provoca un serio cuadro clínico en los peces infectados, produciendo sustanciales mortalidades (Bustos P., y cols., 1999). Más recientemente, existe temor sobre la aparición de otro virus causante de la anemia infecciosa de salmones o ISAV (ver Salmonoticias Nº 71; pág. 11; 1999 y Cassigoli J., 1999). Finalmente los agentes micóticos, tales como los pertenecientes al género *Saprolegnia*, también son una constante amenaza a todas las especies de salmonídeos cultivados en Chile (Enríquez R., 1999).

El Síndrome Rickettsial del Salmón se presentó por primera vez en el año 1989 en el sur de Chile y fue reportada en salmones coho (*Oncorhynchus kitsutch*), pero luego se encontró que también afectaba al salmón Atlántico (*Salmo salar*), salmón Chinook (*O. tshawytscha*), trucha arcoiris (*O. mykiss*), entre otras especies de salmonídeos (Bravo y Campos, 1989). Los signos clínicos que caracterizan a un pez afectado con Síndrome Rickettsial son el nado en la superficie del agua, letargia, anorexia, orillamiento, choque contra las paredes de las jaulas y oscurecimiento de la piel. Las lesiones macroscópicas externas más relevantes incluyen descamación, palidez branquial, hemorragias equimóticas y petequias en la base de las aletas, nódulos y úlceras en la piel, y los niveles de hematocrito reflejan una severa anemia (Elizalde J., 1993). Mediante análisis anatomopatológico de la cavidad abdominal, es



frecuente encontrar la presencia de líquido ascítico, reno y esplenomegalia, nódulos blanquecinos en el hígado, presencia de una pseudomembrana en el corazón y hemorragias petequiales en el estómago, intestino, vejiga natatoria, muscular y grasa visceral. En la mayoría de los casos, el intestino está lleno con un contenido mucoso amarillento y el estómago con un líquido transparente seromucoso. Desde el punto de vista histopatológico las lesiones principales corresponden a necrosis en diversos órganos y tejidos, siendo los más afectados el riñón, hígado, intestino y cerebro. Además se puede encontrar macrófagos conteniendo microorganismos dentro del citoplasma (Larenas y cols., 1998).

El agente etiológico de este síndrome, fue identificado por primera vez en 1990 por Fryer (Fryer y col., 1990); pero sólo en 1992 se pudo establecer de modo más específico la relación de esta bacteria con otras especies de rickettsias, determinando mediante la secuencia del gen del ARN 16S el origen de un nuevo género y una nueva especie que se denominó *Piscirickettsia salmonis* (ATCC UR 1361) (Fryer y col., 1992). La bacteria se caracteriza por ser Gram negativa, pleomórfica, inmóvil, no encapsulada, cocoide, con un tamaño variable entre 0,5 -1,5 μm . En cultivo, este patógeno sólo crece en líneas celulares de salmón, tal como células CHSE-214, dentro de vacuolas citoplasmáticas asociada a otras formando agregados de bacterias, aunque también se ha observado como argollas aisladas. Presenta tinción con reactivo de Giemsa, Hematoxilina-Eosina, Azul de metileno, entre otros. Mediante microscopía electrónica se ha podido observar que esta bacteria presenta dos membranas, una externa ondulada y una interna citoplasmática, lo cual se ha observado en otros agentes rickettsiales. Mediante esta misma técnica, se ha podido demostrar la presencia de estructuras similares a ribosomas cerca de la membrana plasmática, un ADN fibrilar en la región central y estructuras esféricas electrondensas (Larenas y col., 1998).

Medidas de prevención

En la actualidad el SRS ha sido controlado parcialmente mediante el uso de antibióticos los cuales no han resultado ser totalmente efectivos en el combate de la enfermedad. Entre los antibióticos con mejores perspectivas para el tratamiento del SRS, están las quinolonas, por su amplio espectro, baja CMI y acción intensamente



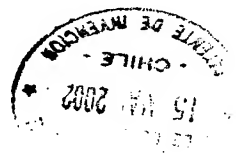
bactericida. Sin embargo, estos fármacos tienen efectos colaterales, tales como la generación de resistencia de los patógenos, toxicidad, hipersensibilidad e inmunosupresión (Arriagada R., 1996). El uso de antibióticos tiene problemas que se relacionan con regulaciones aprobadas en 1997 por la FDA de los Estados Unidos de Norteamérica y por la Comunidad Económica Europea que exigirán que todos los productos provenientes de la acuicultura deberán llegar a sus respectivos mercados sin residuos de antibióticos. Esto sin duda que será un problema para los productores chilenos si se piensa que en Chile se destina el 80 % de los antibióticos disponibles en el mercado nacional al combate de la *P. salmonis* (ver Aquanoticias N° 37; pág. 20; 1997).

Bacterinas y vacunas a base de proteínas recombinantes.

Recientemente, Smith y col., (1995) describieron los resultados de protección parcial obtenidos al inmunizar salmónes coho con una bacterina clásica para *P. salmonis*, preparada con la cepa ATCC del patógeno crecido en células CHSE-214 y posteriormente fijado con paraformaldehído. Los peces fueron desafiados en forma natural, esto es transfiriéndolos luego de la esmoltificación a un sitio con piscirickettsiosis endémica.

Gaggero presentó en 1995 una solicitud de Patente Chilena (Gaggero 1995) referida a un procedimiento de obtención de una vacuna contra el síndrome rickettsial del salmón producido por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. El método descrito en esa solicitud de patente comprende un proceso de producción de una vacuna inactivada, del tipo bacterina. Para ello inicialmente debe propagarse la bacteria en cultivos celulares de peces y una vez purificada, se inactiva y se diluye en un disolvente adecuado, quedando lista para su uso inyectable.

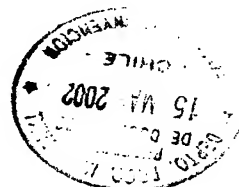
Otra posibilidad son las vacunas basadas en proteínas recombinantes. Si se logra identificar antígenos involucrados en la respuesta inmune humoral y/o celular de salmonídeos contra *P. salmonis*, es posible, usando la metodología de Biología Molecular, clonar y expresar estas moléculas en vectores apropiados, ya sea en bacterias, levaduras o células animales, para posteriormente estudiar su carácter protectivo. Este tipo de procedimientos ha sido empleado en el estudio de



numerosas patologías que afectan a los humanos y entre ellas, algunas de las enfermedades que son provocadas por bacterias del género *Rickettsia*. En el caso de la fiebre de los matorrales, producida por la *R. tsutsugamushi*, se ha determinado la presencia de dos polipéptidos, de masas moleculares de 56 y 58 Kd, localizados en la superficie de la bacteria, los que serían predominantes en la infección (Tamura y col., 1985) y cuyos genes han sido clonados (Stover y col., 1990 a). En el caso de la fiebre de la Montañas Rocosas, producida por la *R. rickettsii*, se ha identificado y clonado el gen para una proteína de 155 KD, localizada en la pared celular de la bacteria y mediante anticuerpos monoclonales se ha determinado la presencia de epítomos sensibles al calor. Este antígeno, al ser inoculado en ratones, los protege del efecto letal de la bacteria (McDonald y col., 1987). Es interesante destacar, que una proteína análoga de 155 Kd, ha sido identificada en *Rickettsia conorii* y el gen que la codifica se ha clonado y expresado en *E. coli*. Al inocular cobayos con un lisado de la bacteria recombinante, se obtiene protección a la infección con la cepa homóloga de *Rickettsia conorii* y también protección parcial a la infección experimental con una cepa heteróloga como es *Rickettsia rickettsii* (Vishwanath y col., 1990).

VACUNAS DE ADN

El desarrollo de nuevas estrategias de vacunación contra *P. salmonis* se justifica por el hecho de que a la fecha la enfermedad no ha sido controlada y sólo existe una vacuna comercial tipo bacterina con registro al día, pero cuyos resultados son controversiales para los expertos en salud animal abocados al tema del SRS (ver Aqunoticias N° 47; pág. 7; 1999). Existen varias vacunas en etapa experimental, cinco de ellas son del tipo bacterinas, una proteína aislada (antígeno purificado) y una basada en ADN recombinante (ver Aqunoticias N° 47; pág. 9; 1999). La producción de una vacuna tipo bacterina, involucra el cultivo, la purificación y posterior inactivación de la bacteria. El proceso de cultivo puede tomar hasta 2 semanas cuando no hay problemas de contaminación, hecho que no es trivial cuando se trata de cultivar una bacteria que en cultivo celular es prácticamente sensible a todos los antibióticos. El proceso de purificación es costoso, lento e inadecuado para un escalamiento como el que se requeriría para una vacunación



masiva de millones de salmones. También se ha demostrado que una vacunación con bacterinas requiere de adyuvantes para la potenciación de la respuesta inmune del pez y de dosis adicionales de refuerzo, situación que produce rechazo en los salmicultores porque implica una doble manipulación de los peces lo cual puede generar un estrés tan alto que puede provocar mortalidades mayores a las que se pueden producir con un posible brote de SRS (ver Aquanoticias N° 47; pág. 8; 1999). Además, no se conocen trabajos en que se demuestre que las bacterinas son capaces de inducir inmunidad celular, lo cual es muy importante cuando se trata de patógenos de vida intracelular como lo es *P. salmonis*. Por otro lado, vacunar con antígenos puros también plantea problemas, entre ellos se puede mencionar el hecho de que por tratarse de proteínas usualmente obtenidas a partir de ADN recombinante son clonadas y expresadas en microorganismos, generalmente producidas dentro de cuerpos de inclusión, desde donde deben recuperarse y purificarse, proceso que toma tiempo y eleva los costos de producción. Las proteínas además, una vez que son obtenidas deben mantenerse en frío para su óptimo funcionamiento, y este último hecho las hace poco viables en regiones donde se carece de sistemas de cadena de frío. Otros sistemas de vacunación, tales como los basados en vectores virales presentan el inconveniente de que pueden ser ineficientemente atenuados y revertir hacia una cepa virulenta (Hilleman R., 1995). Además, debido a que requieren integrarse al genoma del huésped pueden provocar mutaciones indeseables (Kurth R., 1995).

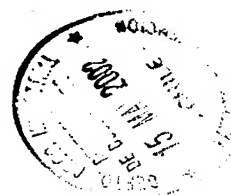
La tecnología de vacunación con ácidos nucleicos se refiere al procedimiento mediante el cual se induce una respuesta inmune a una proteína expresada "in vivo" luego de la introducción de una secuencia oligonucleotídica que codifica para esta proteína. Esta tecnología es radicalmente diferente a las vacunas clásicas que contienen el material inmunogénico, ya sea en la forma de un agente patológico inactivado o más recientemente como una subunidad del agente patológico, sea este purificado a partir del patógeno o producido por ADN recombinante o mediante síntesis química de péptidos. La posibilidad de desarrollar vacunas basadas en ácidos nucleicos nació en 1990 cuando Felgner y sus colaboradores (Wolff y cols., 1990) describieron que la inyección de genes reporteros en células musculares, resultaba en la expresión de las proteínas codificadas por el material genético. Dos años más tarde Tang y colaboradores (Tang y cols., 1992) demostraron que la



inmunización de animales con microesferas de oro coloidal recubiertas con ADN plasmidial resultaba en la aparición de una respuesta inmunogénica de los animales hacia las proteínas codificadas por el ADN inyectado. Posteriormente Liu y colaboradores (Ulmer y cols., 1993) demostraron que la inmunización de los animales con ADN codificador de proteínas del virus de la influenza inducían una inmunidad protectora contra el patógeno. En esos experimentos los ratones fueron inmunizados con ADN plasmidial que contiene un inserto codificador de las proteínas del virus, los cuales desarrollaron una respuesta inmune humoral y celular suficiente para proteger a los animales de un desafío letal con el virus influenza. Recientemente, varios investigadores han reportado la eficacia de las inmunizaciones con ADN para provocar respuestas inmunes protectoras en modelos animales de varias enfermedades infecciosas algunas de las cuales incluyen patógenos intracelulares como *P. salmonis*. Entre estas se incluyen influenza (Ulmer y cols., 1993; Montgomery y cols., 1993; Robinson y cols., 1993), (Xiang y cols., 1994), malaria (Sedegah y cols., 1994; Hoffman y cols., 1995), leishmaniasis (Xu y cols., 1994), virus papiloma (Donnelly y cols., 1995), herpes (McClements, 1995; Rouse, 1995), tuberculosis (Lozes E. y cols; Lowrie D., y cols. 1997) y virus herpes de bovino (Babiuk y cols., 1995).

Las vacunas de ácidos nucleicos pueden estar basadas en ARN o en ADN, aunque la gran mayoría de los estudios realizados en animales hasta hoy en día se han basado en ADN. A pesar de que el ARN mensajero es sin duda más atractivo desde el punto de vista de la baja posibilidad de integración en el genoma, no parece ser el vehículo de preferencia debido a su inestabilidad y mayor dificultad de producción.

Dos factores deben tomarse en cuenta al considerar que tipo de tejido es el óptimo para inmunizaciones con vacunas de ADN, como son el nivel de antígeno expresado y la accesibilidad del antígeno al sistema inmune. La cantidad de antígeno producido dependerá de la cantidad de ADN incorporada a las células, la cual a su vez depende del tipo de células y de la formulación del ADN. El nivel de expresión dependerá en parte de la actividad o potencia del promotor y de otros elementos genéticos que optimicen la transcripción y la traducción presente en el vector. Para un mismo promotor, esta actividad puede variar en diferentes tejidos. Los vectores de expresión poseen un promotor eficiente, los cuales son usualmente promotores virales tales como los del Citomegalovirus humano, Virus de simios 40 (SV40), Virus



del Sarcoma de Rous (RSV). Estos promotores no son tejido específico, tienen expresión constitutiva, y pueden ser sustituidos por elementos promotor/enhancers especie y tejido-específicos como es el caso del gen de la β -actina de carpa *Cyprinus carpio* (Liu Z. y cols., 1990). Además, de una región que contiene secuencias para múltiples cortes con varias enzimas de restricción, los vectores poseen un sitio de poliadenilación, para aumentar la estabilidad del ARNm. Con este fin, usualmente se usa la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona de crecimiento de bovino, BGHpA (Donnelly J., y cols., 1997). También deben poseer un origen de replicación procariótico, para la eficiente propagación del plasmidio en células de *E. coli* competentes. Los marcadores de selección más usuales que llevan los vectores de expresión plasmidiales utilizados en vacunas de ADN son Ampicilina o Kanamicina. Experimentalmente se ha encontrado que si entre la región promotora y la secuencia de poliadenilación se coloca un intrón (secuencia no codificante) se aumenta varias veces la eficiencia de expresión del vector (Barry M., y Johnston S., 1977a).

La accesibilidad del antígeno al sistema inmune es otra variable importante y que dependerá de su presentación. Para inducir una respuesta de tipo humoral, el antígeno deberá ser presentado en la superficie de la célula transfectada con el ADN o secretada y procesada por células presentadoras de antígeno, lo cual dependerá del tipo de vector utilizado. Para provocar una respuesta celular, deberá inducirse una presentación adecuada de péptidos derivados del antígeno por moléculas codificadas por el MHC del sistema hospedero. (Donnelly J., y cols., 1997), (Sewell A., y cols., 1999; Whitton J., y cols., 1999).

La transferencia de ácidos nucleicos al animal o individuo vacunado puede ser llevada a cabo de varias maneras. La formulación más comúnmente usada es la transferencia de ADN plasmidial o de ADN contenido en un vector viral (adenovirus, retrovirus, vaccinia, herpes, etc.). El ADN plasmidial ofrece varias ventajas potenciales ya que es muy estable y más fácil de preparar en forma reproducible. Además, en contraste con los vectores virales, el ADN plasmidial está usualmente diseñado para permanecer en forma episomal, es decir, sin capacidad para integrarse al genoma del animal. Muchos de los vectores virales en general requieren de integración al genoma lo que podría resultar en activación de oncogenes o en inactivación de genes supresores de tumores. (Nichols y cols.,



1995). Una de las rutas de inmunización con ADN más estudiadas ha sido la inyección directa de material genético al tejido muscular. Por ejemplo, Davis y colaboradores (Davis y cols., 1993) han demostrado que una sola inyección de ADN codificador del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B, en músculo esquelético de ratón, induce una rápida, potente y sostenida respuesta inmune humoral y celular. A pesar de la baja eficiencia de la transferencia genética en músculo maduro, ésta es suficiente para los propósitos de inmunización. Por ejemplo, una inyección de solo 10 microgramos de ADN en el músculo de la tibia anterior de ratón, induce anticuerpos en un nivel superior a las 10 mIU/mL, nivel considerado suficiente para conferir inmunidad protectora en humanos (Davis H., y cols., 1993). Se ha observado que la potencia de la respuesta inmunológica está claramente relacionada con la dosis de la vacuna y con la eficiencia de la transfección. Así, métodos que mejoran la incorporación de ADN a las células mejoran la respuesta inmunológica. Por ejemplo, la inyección de ADN en 25% sacarosa resulta en un aumento de cien veces en el nivel de anticuerpos (Davis y cols., 1993). Estos autores también han demostrado que la respuesta inmune obtenida como resultado de inmunización por ADN es persistente, demostrándose que el nivel de anticuerpos obtenido se mantiene por lo menos por 17 semanas luego de una sola inyección de ADN.

Una variación tecnológica muy interesante ha sido descrita recientemente por Barry y colaboradores (Barry y cols., 1995). Estos autores desarrollaron un método para la obtención de vacunas de ADN, basado en la inmunización con genotecas de expresión, las que potencialmente codifican todas las proteínas del agente infeccioso. Esto permite desarrollar vacunas incluso contra patógenos sobre los cuales se conoce muy poco de antígenos protectivos, ya que no es necesario saber que genes del patógeno están asociados a inmunidad. Barry y colaboradores demostraron que la inmunización de ratones con genotecas de expresión obtenidas a partir de ADN genómico completo de *Mycoplasma pulmonis*, un patógeno natural de roedores, era capaz de desarrollar inmunoprotección contra un desafío con el patógeno. Esta tecnología se basa en que todos los antígenos del patógenos están codificados finalmente en su genoma. Por esto el método involucra hacer una genoteca de expresión del genoma del patógeno en vectores adecuados que permiten la expresión de los potenciales genes antigénicos o de parte de ellos que



hayan logrado clonar. Este genoma puede ser luego reducido en sucesivas etapas de fraccionamiento hasta llegar a plasmidios protectivos individuales. Por ello, este enfoque permite también descubrir genes candidatos individuales y utilizarlos como vacunas recombinantes. El asunto crítico en la aplicación de una inmunización con genotecas de expresión, es su sensibilidad. Por ejemplo, para cubrir el genoma de un patógeno bacteriano de 3×10^6 pb en fragmentos de 500 pb requeriría aproximadamente de 6.000 clones. Pero, solamente 1/6 de éstos estaría en el marco y dirección correcta. De modo que un equivalente de expresión requeriría de 36.000 clones. Por último, es importante destacar que en peces (Kanellos y cols., 1999) y, específicamente en carpas (*Cyprinus carpio*), en truchas (*Oncorhynchus mykiss*) y en pez dorado (*Carassius auratus* L.), ha sido descrita la metodología para expresar genes exógenos inyectados intramuscularmente (Hansen y cols., 1991; Anderson y cols., 1996 a y Russell y cols., 1998, respectivamente.). En el segundo caso además, el grupo de Anderson ha demostrado que las truchas inyectadas en la musculatura esquelética, con un plasmidio que contiene los genes que codifican para proteínas del virus de la necrosis hematopoyética infecciosa (IHNV) y que están bajo el control de un promotor de citomegalovirus, producen anticuerpos neutralizantes los cuales confieren protección a las truchas cuando son desafiadas con IHNV (Anderson y cols., 1996b).

Herrmann, et al. (United States Patent 6,165,993) describen una aplicación concreta de las vacunas de ADN para generar respuesta inmune contra rotavirus en diferentes vertebrados.

Para el caso particular de la aplicación de las vacunas de ADN contra enfermedades rickettsiales, Barbet et al. (United States Patent 6,025,338) dieron a conocer una composición que comprende un polinucleótido aislado, que es capaz de inducir respuesta inmune contra una enfermedad causada por una rickettsia patógena, entre las que se encuentran *Cowdria ruminantium*, *Ehrlichia chaffeensis* y *Anaplasma marginale*.

La patente de invención de Davis (United States Patent 6,180,614) describe la utilización general de las vacunas de ADN como método de inmunización de especies de acuicultura. Esta patente también da a conocer los métodos de administración de los sistemas de expresión de ADN a los peces. Tales métodos incluyen la técnicas de inyección, pulverización e inmersión.



LAS PROTEINAS DE ESTRÉS TÉRMICO Y LA RESPUESTA INMUNE

La familia de proteínas de estrés térmico (HSP) son moléculas de estructura conservada que juegan un papel importante dentro la célula. Las HSP están encargadas de hacer posible el enrollamiento, desenrollamiento y ensamblaje correcto de las proteínas, incluyendo la maduración de complejos proteicos multiméricos, como por ejemplo aquellos de las inmunoglobulinas y MHC. También se ha comprobado su participación en los procesos de translocación de proteínas entre compartimientos celulares diferentes. Al parecer, estas proteínas juegan un rol en la protección y patogénesis en varias infecciones y enfermedades de autoinmunidad. Durante episodios de estrés, la síntesis de HSP's aumenta dramáticamente, representando uno de los mecanismos más importantes para la sobrevivencia de la célula. Se ha demostrado que estas proteínas representan antígenos dominantes en una multitud de episodios infecciosos induciendo importantes respuestas inmunológicas humorales y celulares.

Al penetrar, al ambiente intracelular de una célula huésped, un microorganismo se enfrenta a una serie de cambios estresantes. Bajo estas condiciones, la síntesis de las HSP microbiana incrementa significativamente, aumentando las posibilidades de sobrevivencia. Como consecuencia de ésto, las HSP son los principales antígenos que en varias enfermedades infecciosas inducen una fuerte respuesta inmune. Hay un gran grado de homología en la secuencia de las HSP entre microorganismos de virulencia muy variable. La posible ventaja para el sistema inmune de centrarse en las secuencias conservadas de las HSP compartidas por varios microorganismos diferentes es la posibilidad de montar rápidamente una respuesta inmunológica amplia, reduciendo el riesgo de colonización del huésped por el patógeno.

La nomenclatura de los HSP se ha diseñado de tal modo que el peso molecular de la proteína la identifica como perteneciente a un grupo, los cuales varían en tamaño desde la familia de los HSP10 hasta la familia de los HSP100, estos últimos principalmente en eucariontes.

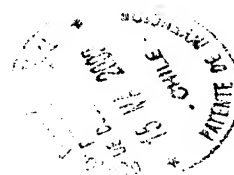


Diferentes miembros de la familia de HSP representan blancos para la respuesta inmune, siendo la HSP60 el antígeno principal en infecciones bacterianas. Por ejemplo, en el caso de micobacterias, en la lepra y tuberculosis la respuesta inmune contra HSP60 predomina sobre las demás HSP. En contraste, una respuesta dirigida a HSP70 ha sido encontrada en humanos infectados con parásitos tales como malaria, leishmaniasis, filiarasis y candidiasis.

Las HSP16 y HSP10 son chaperonas las cuales se unen a polipéptidos recién sintetizados en los ribosomas, a proteínas que atraviesan las membranas de organelos y a proteínas que se han desnaturalizado. Esta unión, desempeña un papel protector y evita que las proteínas alcancen un estado de agregación irreversible. Sin negar que las chaperonas intervengan de forma directa en el plegamiento de las proteínas, en la mayoría de los casos parecen transportar los polipéptidos desnaturalizados hasta las chaperoninas familia de proteínas que comparten homología en su secuencia aminoacídica y su peso molecular está en torno a los 60 Kd.

Ambas participan en la respuesta al estrés o respuesta al choque térmico, permitiendo la adaptación a ambientes extremos, activando mecanismos innatos de defensa y; en un segundo frente, mecanismos de defensa adquiridos, mediante la estimulación de la producción de anticuerpos y linfocitos T (Zügel y col, 1999b).

Las HSP10 también descrita como GroEs de *E. coli*, están constituidas por un heptámero de la proteína del mismo nombre. En presencia de GroEL (HSP60) y de algún nucleótido (ATP, ADP o incluso algún análogo no hidrolizable de ATP), el oligómero se une a GroEL y tapa la cavidad de uno de sus anillos permitiendo la funcionalidad del complejo GroEL-GroES-ATP, el cual: Impide la agregación de los polipéptidos parcialmente plegados y liberados de los ribosomas, se une a péptidos parcialmente plegados aunque atrapados en una conformación tal que no pueden plegarse de manera espontánea y, proteger a las proteínas de la desnaturalización. En resumen este complejo facilita un plegamiento correcto de las proteínas desnaturalizadas.



Las HSP16 son inducidas por condiciones de estrés en nematodos como *Caenorhabditis elegans* (Yanes y col., 1999) y bacterias como *Mycobacterium bovis* (Rhodes y col., 2000) y *Helicobacter pylori* (Ferrero y col., 1995; Kansau y col., 1996) y cumplen funciones similares a las HSP10.

Las HSP10 y 16 han sido seleccionadas como candidatos a antígenos, además de las características mencionadas anteriormente, por la alta homología de secuencias y presencia de dominios antigénicos altamente conservados los cuales han resultado ser buenos inmunógenos (Mats y col., 1997), y por la eficaz respuesta humoral y celular producida en ratones luego de la inmunización con diversos antígenos como por ejemplo: Los antígenos de *Escherichia coli* correspondientes a HSP60, 10 y 15 (Zügel y col., 1999a y 1999b); *Mycobacterium leprae* HSP65, 10 y 18 (Mehra y col., 1992; Thole y col., 1995); *Helicobacter pylori* con el complejo GroEs-GroEL (HSP60-HSP10) (Kansau y col., 1996; Ferrero y col., 1995); *Mycobacterium bovis* HSP16 (Rhodes y col., 2000). Por último como antígenos específicos de tumores, han permitido la generación de respuesta inmune contra diversos tipos de tumores (Raquena y col., 1997).

Vacunación con HSP

Protección inducida por vacunación con HSP ha sido demostrada en varios modelos animales. Por ejemplo, la inmunización de ratones con HSP60 de *Helicobacter pylori*, *Histoplasma capsilatum* o *Yersinia euterolítica* induce una protección muy significativa para cada uno de los patógenos respectivos. También, inmunización de ratones con HSP60 de micobacteria, administrada como proteína o ADN, induce una fuerte respuesta de células T, *in vivo*, y una significativa protección contra la infección por *Mycoplasma tuberculosis*. Igualmente, la HSP70 de *M. tuberculosis* inyectada como ADN en ratón induce una importante protección contra tuberculosis, un patógeno intracelular.

Como antecedente del estado de la técnica, se debe considerar también las recientes patentes de Srivastava (United States Patent 6,168,793 y United States Patent 6,143,299). En ellas se dio a conocer el empleo de preparaciones de



proteínas del estrés térmico para la prevención y el tratamiento del cáncer y de enfermedades infecciosas.

Definición del Problema Resuelto por la Invención

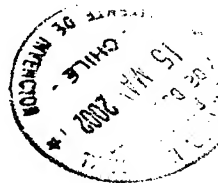
Actualmente hay una necesidad creciente de vacunas para las infecciones masivas de especies de acuicultura. Tal como se explicó anteriormente, las vacunas existentes en el mercado basadas en bacterinas son de uso restringido y con escasa documentación acerca de su efectividad. Además, la producción de bacterinas para SRS es de alto costo, debido a la complejidad del sistema de cultivo. La presente invención soluciona los problemas del presente estado de la técnica, empleando los conocimientos modernos de biología molecular, para producir vacunas de ADN y vacunas recombinantes contra el SRS. Ello permite la producción de estas vacunas en gran escala y con alta efectividad, haciéndose independiente de los complejos sistemas de cultivo requeridos para la proliferación de *Piscirickettsia salmonis*.

Definición de la invención

En general, la invención se refiere a una vacuna de ADN para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, especialmente en especies de acuicultura, tales como el salmón coho, el salmón del Atlántico, el salmón chinook o la trucha, basada en un fragmento de ADN que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10), y su procedimiento de preparación. La invención también describe un oligonucleótido purificado útil para la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados y una vacuna recombinante preparada a partir de este oligonucleótido.

El término "vacuna" se refiere aquí a cualquier material capaz de producir una respuesta inmune en el animal que ha recibido este material.

La vacunación con ácidos nucleicos se refiere al procedimiento mediante el cual se induce una respuesta inmune a una proteína expresada "in vivo" luego de la introducción de una secuencia oligonucleotídica que codifica para esta proteína. Por



lo tanto, el concepto de "vacuna de ADN", tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier segmento de ADN que al ser introducido a un animal, produce la respuesta inmune explicada en la frase anterior.

El principal objeto de la presente invención es una vacuna de ADN, que comprende un fragmento de ADN que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta, insertado en un plásmido vector adecuado para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

En una realización preferida de esta invención, dicho fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 (ver Figura 1) o un fragmento de ésta. Alternativamente, dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que la proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácidica Sec Id N° 2 (ver Figura 2) o una región inmunogénica de ésta.

En otra realización preferida de la vacuna de ADN de acuerdo a la invención, el plasmidio vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección. Preferentemente, dicho plasmidio vector es el plasmidio pUK21-A2.

En particular, dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón coho, el salmón del Atlántico, el salmón chinook o la trucha.



En otra realización preferida de la vacuna de ADN de acuerdo a la invención, ella se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización y la inmersión. Además, la vacuna comprende un adjuvante adecuado y/o un transportador farmacéuticamente aceptable.

En otra versión prevista de la presente invención, la presencia de anticuerpos contra el HSP10 generados por la vacuna de ADN se detecta por un método, según el cual después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra el HSP10 mediante ELISA.

Un segundo objeto principal de la invención es un procedimiento para la preparación de la vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, que comprende las siguientes etapas:

- a) Clonar el fragmento de ADN que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta
- b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para su expresión y generación de una respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

En una realización preferida, el procedimiento comprende un fragmento de ADN corresponde a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta. Alternativamente, el fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que la proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 2 (ver Figura 2) o una región inmunogénica de ésta.

En otra realización preferida, el procedimiento comprende el plasmidio vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del



ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección. Preferentemente, dicho plasmidio vector es el plasmidio pUK21-A2.

En particular, el vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón coho, el salmón del Atlántico, el salmón chinook o la trucha.

En otra realización preferida del procedimiento según la invención, la vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización y la inmersión.

Un tercer objeto principal de la invención es un segmento de ADN purificado útil para la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta. En una realización preferida de esta invención, el segmento de ADN tiene la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 (ver Figura 1) o un fragmento de ésta. Alternativamente, el segmento de ADN tiene una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado. Para ambas realizaciones, se ha llegado a establecer que la proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 2 (ver Figura 2) o una región inmunogénica de ésta.

En particular, el vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón coho, el salmón del Atlántico, el salmón chinook o la trucha.

En otra realización de la presente invención, el oligonucleótido se emplea para producir una vacuna recombinante para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, donde la proteína de estrés térmico 10 (HSP 10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta se produce



empleando un vector de expresión y un hospedero adecuados. En particular, el vertebrado corresponde a una especie de acuicultura, preferentemente es el salmón coho, el salmón del Atlántico, el salmón chinook o la trucha. En otra versión prevista, el vector de expresión es un plasmidio, preferentemente, el vector pET32a. Por otra parte, se ha determinado que el hospedero es una bacteria, . preferentemente *E. coli*.

En otra realización preferida de la vacuna recombinante de acuerdo a la invención, ella se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización y la inmersión. Además, la vacuna comprende un adjuvante adecuado y/o un transportador farmacéuticamente aceptable.

En otra versión prevista de la presente invención, la presencia de anticuerpos contra el HSP10 generados por la vacuna recombinante se detecta por un método, según el cual después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra el HSP10 mediante ELISA.

Descripción de las Figuras

FIGURA 1:

Esta figura muestra la secuencia nucleotídica (Sec Id N° 1) del gen que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP10) de *Piscirickettsia salmonis*.

FIGURA 2:

Esta figura muestra la secuencia aminoacídica (Sec Id N° 2) de la proteína de estrés térmico 10 (HSP10) de *Piscirickettsia salmonis*.

FIGURA 3:

En esta figura se muestra la representación esquemática del plásmido pUK21-A2.

FIGURA 4:



En esta figura se muestra la representación esquemática del plásmido pUK21-A2, conteniendo el inserto con el gen de HSP10, denominado pUK21-A2 HSP10.

FIGURA 5:

En esta figura se muestra la estructura del plasmidio pET-32a

FIGURA 6:

En esta figura se muestra la estructura del plasmidio pET32a-HSP10

FIGURA 7:

En esta figura se muestra la producción de HSP10 de *P. salmonis* en *E. coli*

Los siguientes ejemplos ilustran algunas aplicaciones concretas de la invención, pero no pretenden limitar el marco ni los alcances de la presente invención.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Aislamiento, clonación y secuencia del gen de HSP10 de *P. salmonis*

a) Cultivo de Células CHSE-214

Inóculos de células CHSE-214 (ATCC 1681), mantenidos en N₂ líquido se descongelaron y se cultivaron en frascos T 175 en medio MEM a 16°C por 7 días o hasta que las células lleguen a confluencia.

b) Cultivo de *P. salmonis*.

Se usaron inóculos de *P. salmonis* que contienen al menos un título de 1×10^8 bacterias/mL a cada uno de los frascos T175 con células CHSE-214. Al día siguiente, se retiró el medio y se agregó 50 mL de medio MEM-completo fresco. El cultivo se realizó a 16°C por 10 a 14 días, observando periódicamente al microscopio de contraste de fases, el grado de lisis de las células CHSE-214 provocada por la infección bacteriana. Cuando el efecto citopático fue de alrededor del 100% de las células, el cultivo de *P. salmonis* se consideró listo para ser cosechado o para una posterior propagación del cultivo. Las bacterias se cosecharon utilizando un raspador de células. Una vez colectado, el lisado se centrifugó y el sobrenadante colectado corresponde a la fracción semipurificada de *P. salmonis*.

c) Purificación de *P. salmonis*



Para purificar la bacteria, la suspensión con la fracción semipurificada de *P. salmonis* se sometió a una centrifugación en gradiente de densidad obteniéndose una banda mayoritaria cerca del fondo del tubo de centrifuga. Esta banda se colectó y se lavó dos a tres veces mediante centrifugación con una solución tampón. El sedimento o pellet final constituye la fracción purificada de *P. salmonis*.

d) Preparación de ADN genómico de *P. salmonis*

Nuestro procedimiento se basa en el protocolo de Binder, (Binder, 1995, Mitochondrial nucleic acid purification and analysis. Methods in Molec. Biol. 20:1). En breve, la fracción purificada de *P. salmonis* se lavó con tampón PBS y se le agregó 20 μ L de una solución de 10 mg/mL de DNasa I y se incubó a 37°C durante 30 min. Luego de la centrifugación para eliminar el sobrenadante, el pellet se resuspendió en 500 μ L de PBS mas 100 μ L de EDTA 0,1 M para detener la actividad de la DNasa I. Se agitó suavemente por inversión, se volvió a centrifugar y el pellet exento de DNasa I, se resuspendió en 1 mL de tampón de lisis (sacarosa 0,75 M, NaCl 400 mM, EDTA 20 mM, Tris-HCl 50 mM, SDS 0,2 %, 1 mg de Proteinasa K, pH 9). Se agitó suavemente por inversión y se incubó a 58°C durante 1 hora con agitación suave. Una vez terminada la incubación con la proteasa, la solución se extrajo con un volumen de fenol saturado con Tris-HCl (pH 8) y luego se extrajo 2 veces con una mezcla de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1. Posteriormente, el ADN se precipitó con 0,4 volúmenes de acetato de amonio 5 M y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío a -20°C durante 30 min.

e) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En tubos Eppendorf de 500 μ L autoclavados, se les agregó 5 μ L de tampón PCR 10 X sin Mg, 1,5 μ L de $MgCl_2$ 50 mM, 4 μ L de mezcla de dNTP 2,5 mM, 2 μ L de cada uno de los oligonucleótidos partidores (14,1 μ M de cada uno), 100 ng de ADN templado, 0,5 μ L de Taq ADN polimerasa 5 U/ μ L y se completó a un volumen final de 50 μ L con agua miliQ estéril. Es emplearon las condiciones experimentales indicadas por Mauel y colab., 1996 (Diseases of Aquatic Organisms, 26:189).

f) Electroforesis en geles de agarosa



Para determinar la integridad del ADN genómico de *P. salmonis*, así como la del ADN plasmidial, y la de los productos de amplificación, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 1 y 2%. Este procedimiento se efectuó de acuerdo a Sambrook y colab., 1989 (Molecular cloning: A laboratory Manual, CSHL, New York).

g) Clonamiento y secuenciación del gen hcp10 de la proteína de estrés térmico de *P. salmonis*.

Mediante el uso de algoritmos para la comparación de homología de secuencia de ADN (PCGene y National Center for Biotechnology Information) se determinó la localización de las secuencias más conservadas en el gen de HSP10 de *Rickettsia* y de otras bacterias cuyos genes de estas proteínas muestran homologías con *Rickettsia*. Paralelamente, se realizaron análisis de hidrofiliidad de las HSP de estas especies para determinar las regiones de la proteína donde existen determinantes antigénicos fuertes. Con esta información se definió las regiones de HSP10 de *P. salmonis* a ser amplificadas mediante PCR.

Basándose en homologías con los genomas de otros organismos en particular *Legionella pneumophila* y *Coxiella burnetii* se diseñaron los partidores a) sentido y b) antisentido, los cuales se utilizaron en una reacción polimerásica en cadena, usando DNA cromosomal de *P. salmonis* altamente purificado como templado. Este proceso dio origen a un fragmento de aproximadamente 290 pares de bases que fue clonado en el vector pGEMt. Una vez aislado DNA del plasmidio resultante (pGEMt HSP10) el inserto se secuenció, demostrándose la presencia de un gen que codifica por una proteínas de 98 aminoácidos, que presenta una alta homología con la HSP10 de otros organismos y también con la secuencia parcial de fragmentos de *P. salmonis* obtenidos anteriormente.

Los resultados se presentan en las Figuras 1 y 2. En la Figura 1 se muestra la secuencia nucleotídica (Sec Id N° 1) del gen que codifica para la proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis* (HSP10). En la Figura 2 se muestra la secuencia aminoacídica (Sec Id N° 2) de la proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis*.

Ejemplo 2: Preparación de un vector para vacuna genética. Clonación del gen de HSP10 de *P. salmonis* en el plasmidio pUK21-A2.

El vector pUK21-A2 posee las siguientes características necesarias para ser utilizado como vacuna de ADN: a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del ARN mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.

a) Preparación de ADN del plasmidio pUK21-A2

ADN plasmidial obtenido de *E. coli* HB 101 se purificó mediante el uso del kit comercial Qiagen Plasmid Purification (Qiagen) de acuerdo a las instrucciones indicadas por el proveedor. El plasmidio se linearizó con la enzima Eco RI, luego los extremos se repararon con ADN polimerasa, de acuerdo a los protocolos de Sambrook y colab., 1989 (Molecular cloning: A Laboratory Manual, CSHL, New York). A continuación se procedió a desfosforilar los extremos del vector linearizado agregando 15 μ L de fosfatasa alcalina (1 U/ μ L) y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente el ADN plasmidial preparado se purificó mediante el sistema "Wizard" (Promega, Madison Wisconsin, USA). La Figura 3 muestra la representación esquemática del plásmido pUK21-A2.

b) Clonación del gen de HSP10 de *P. salmonis* en el vector pUK21-A2.

Para la preparación de un vector para vacuna genética se diseñan 2 nuevos partidores que incluyen las secuencias del comienzo y del final del gen de HSP10 de *P. salmonis* y también las secuencias de sitios específicos para endonucleasas de restricción BamHI y EcoRI.

Estos partidores son a) sentido y b) antisentido:

Mediante estos partidores se efectúa una reacción de polimerasa en cadena usando DNA cromosomal altamente purificado de *P. salmonis* (igual al descrito en el



Ejemplo 1) como templado. Como resultado se obtiene un fragmento de aproximadamente 1.920 pares de bases. Este fragmento se aísla, luego de digestión con las endonucleasas BamHI y EcoRI se liga al plásmido pUK21-A2 generándose el vector vacuna pUK21-A2-HSP10. En la Figura 4 se muestra la representación esquemática del plásmido, conteniendo el inserto HSP10

Ejemplo 3: Desarrollo de anticuerpos en ratones luego de inyección intramuscular del plásmido pUK21-A2-HSP10.

El plásmido que contiene el gen de la HSP en un vector de expresión animal, denominado pUK21A2-HSP10, luego de inyectado en el músculo de ratón es capaz de expresar esta proteína y desarrollar una respuesta inmune que da origen a la aparición de anticuerpos. Esto se demuestra de la siguiente manera. Se prepara una solución de cada uno de los plásmidos en el tampón PBS a una concentración de ADN de 0.5 µg/µl. Ratones, pertenecientes a la cepa Balb/c son inyectados en el músculo del femur de las extremidades posteriores con 2 dosis de 100 µl de una solución de 50 µg/100 µl de ADN plasmidial (se inyectan 50 µl en cada extremidad). Esta inyección se realiza el día cero y una segunda dosis se administra a los 15 días (día 15). Como control se realiza la misma operación usando ADN plasmidial control que no posee el gen de HSP10 (pUK21-A2).

Luego de transcurridos 45 días (día 45) se extrae sangre de los ratones y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra el HSP10 mediante ELISA.

a) Determinación de anticuerpos anti HSP10 mediante ELISA

Los ratones inmunizados a los días 0 y 15 con los plásmidos pUK21A2 y pUK21A2-HSP10 son sangrados al día 45, con un corte en la vena caudal inferior de la cola. Los 250 µl de sangre obtenidos, son incubados a 37°C por una hora a fin de obtener el suero. También se realiza el mismo procedimiento de sangrado y obtención del suero antes de la inmunización. Esta muestra es llamada suero pre-inmune.



La evaluación de la respuesta inmune humoral de los ratones inmunizados con los plamidios se determina por ELISA, tal como se describe a continuación.

- 1.- Placas de poliestireno de 96 pocillos, previamente tratadas con una proteína fenólica bioadhesiva (pegotina), son activadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de antígeno, 50 $\mu\text{l/pocillo}$. Se incuban durante 90 min a temperatura ambiente.
- 2.- Se elimina el antígeno y se bloquean los sitios inespecíficos con una solución de caseína sacarosa al 4%, 300 $\mu\text{l/pocillo}$ durante 60 min a temperatura ambiente.
- 3.- Se adiciona en cada pocillo 50 μl de una dilución seriada del suero de los ratones inmunizados y suero pre-inmune. Se incuba durante 90 min a temperatura ambiente.
- 4.- Se eliminan las muestras de suero y se lava la placa con 300 $\mu\text{l/pocillo}$ de tampón fosfato salino, conteniendo Tween 20 al 0,02%. Esto se realiza 3 veces, con intervalos de 5 min entre cada ciclo de lavado.
- 5.- Se elimina la solución del último lavado y se agregan 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de un anticuerpo de cabra anti inmunoglobulina G de ratón, unido a fosfatasa alcalina, en la dilución recomendada por el fabricante en solución de bloqueo. Se incuba por 30 min a temperatura ambiente y luego se procede como en el punto 4.
- 6.- Se elimina la solución del último lavado y se agregan 50 $\mu\text{l/pocillo}$ de una solución que contiene 1 mg/ml de paranitrofenil fosfato en tampón Tris 100 mM, cloruro de sodio 100mM y cloruro de magnesio 5mM (pH 9.5). Se incuba 30 minutos a 37°C.
- 7.- La reacción será detenida con hidróxido de sodio 3M y se lee en espectrofotómetro a 405 nm de longitud de onda.

Como se indica en los resultados de la Tabla 1, el suero de los ratones inyectados con el plasmidio pUK21A2-HSP10 reacciona con la proteína HSP10 en ELISA indicando que contiene anticuerpos específicos contra esta proteína. En contraste, aquellos ratones inyectados con una preparación control (pUK21A2), no desarrollan anticuerpos contra HSP10. Este ejemplo demuestra que mediante la inyección de genes de HSP10, preparados de acuerdo a lo descrito en esta invención se logra



estimular el sistema inmune del ratón y desarrollar una respuesta humoral en la forma de anticuerpos anti HSP10.

Tabla I. Medición de anticuerpos anti HSP10 en ratones inmunizados con pUK21A2-HSP10.

Muestra	Lectura O.D. 445 nm/30 min	
Suero preinmune	0.02	
Suero ratón inmunizado con pUK21A2 (control)	0.04 *	
Suero de ratón inmunizado con pUK21A2-HSP10	0.25 *	

* Promedio de 4 ratones diferentes.

Ejemplo 4: Producción de la proteína recombinante HSP10 mediante clonamiento del gen HSP10 en el vector de expresión bacteriana pET32a y su posterior purificación

Luego de confirmar la secuencia del gen HSP10, se amplifica este por PCR a partir de ADN genómico mediante partidores sentido y antisentido que contienen en sus extremos los sitios de restricción EcoRI y XhoI respectivamente. Estos oligos son sentido: 5'-TATGAATTCATGGCTGAAATTATTGGTATTG-3' y antisentido 5'-GTACTCGAGCTAACTTCTTCAAACCTCAGCATC-3'. Se clona el fragmento amplificado en el vector pGEMT y se identifican los clones positivos por PCR y digestión enzimática. Se aísla el gen de HSP10 desde el clon pGEMT-HSP10, mediante las enzimas EcoRI y XhoI y se purifica por electroforesis en gel de agarosa. El gen purificado se liga usando ligasa de fago T4 al vector pET32a (Figura 5) cortado con XhoI y EcoRI. Los clones positivos se identifican mediante digestión con estas enzimas. En la Figura 6, se muestra la estructura del plasmidio resultante pET32a-HSP10, el cual expresa una proteína de fusión compuesta de

HSP10 y un segmento que contiene polihistidina usado para su purificación. Se obtuvo ADN plasmidial de uno de los clones recombinantes y se usaron para transformar células competentes de *E. coli*. La expresión de la proteína de fusión Trx-HSP10 se induce en un cultivo de células recombinantes por acción de IPTG ImM. La proteína presente en el sobrenadante bacteriano se purifica por columna de Ni-agarosa. Todos los procedimientos fueron realizados de acuerdo a los protocolos descritos por Sambrook (Sambrook y colab. 1989)

En la figura 7 se presenta un gel de poliacrilamida con SDS hecho de acuerdo a Laemmli que muestra la producción de la proteína de fusión Trx-HSP10 por bacterias recombinantes transformadas con el plasmidio pET32a-HSP10.

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- AquaNoticias (1997): Nº 37 pag. 20; (1999): Nº 47, pag 6-15, Nº 48, 6-13.
- Anderson E. D., Mourich, D.V., Leong, J. A. C. (1996a). Gene expression in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) following intramuscular injection of DNA. Molec. Marine Biol. Biotech. 5:105-113.
- Anderson E. D., Scott, C. F., Acott L., Shepherd, J., Leong, J. A. C. (1996b). Genetic immunization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) against infectious hematopoietic necrosis virus. Molec. Marine Biol. Biotech. 5: 114-122.
- Arriagada R., (1996) Aplicación de la Citometría de Flujo en la Determinación de Sensibilidad *in vitro* de *P.salmonis* a Antibióticos. Tesis para optar al título de Bioquímico, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción.
- Babiuk, L.A., P.J. Lewis, G. Cox, S. Van Drunen, M. Baca-Estrada., S.K. Tikoo.(1995). DNA immunization with bovine herpes-1 genes. In DNA Vaccines: A new era in vaccinology. Annals of the New York Acad. Sciences. 772: 47.
- Barbet et al., Nucleic acid vaccines against rickettsial diseases and methods of use, United States Patent 6,025,338
- Barry, M.A., Wayne C.L, Johnston S.A. (1995). Protection against mycoplasma infection using expression library immunization. Nature 377: 6323.
- Barry, M.A., Johnston S.A.(1997a). Biological features of genetic immunization. Vaccine. 15(8): 788-791.



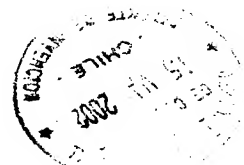
- Barry, M.A., Johnston S.A. (1997b). Genetic to genomic vaccination. *Vaccine*. 15(8): 808-809.
- Bravo S., y Campos M. (1989) Síndrome del salmón coho. *Chile Pesquero* 54: 47-48
- Bruno D., Poppe T., (1996). *A Colour Atlas of Salmonid Diseases*. Academic Press London.
- Bustos P., Midtving P., y Maira C. (1999) IPN, Un enorme desafío para la industria salmonera. *AquaNoticias* N° 48, pág. 48-51.
- Cassigoli J. (1999). Foráneos sin Bienvenida. *Salmonoticias* N° 72, pág. 18-19.
- Davis, H.L., M-L. Michel, R.G. Whalen. (1993). DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum. Mol. Genet.* 2:1847.
- Davis H.L. DNA based vaccination of fish. United States Patent 6,180,614, January 30, 2001 (corresponde a Davis H.L. Composición farmacéutica para la inmunización en peces que consiste en un vector de expresión con una secuencia de control de la expresión capaz de dirigir la expresión de a lo menos un polipéptido antigénico de patógenos virales, bacterianos y parasitarios, útil como vacuna de polinucleótidos para peces. la Solicitud de Patente Chilena 1935-1996)
- Diane C., DeNagel and Pierce S.K. (1993). Heat Shock Proteins in Immune Responses. *Critical Reviews in Immunology* 13, 71-81.
- Dimer, J.J. Donnelly., M.A. Liu. (1993). Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: Optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* 12: 777.
- Donnelly J., Ulmer J., Liu M. (1995). In *DNA Vaccines: A new era in Vaccinology*. *Annals of the New York Acad. Sciences* 772: 40.
- Donnelly J., Ulmer J., Shiver J., Liu M. (1997) *DNA Vaccines*. *Ann. Rev. Immunol.* 15: 617- 648.
- Elizalde J.J., (1993). Estudio de la Respuesta Inmune Humoral de Salmonídeos, Contra el agente Causal del Síndrome del Salmón Coho. Memoria para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- Ericsson, M., Golovliov, I., Sandström, G., Tärnvik, A. and Sjöstedt, A. (1997). Characterization of the Nucleotide Sequence of the *groE* Operon Encoding



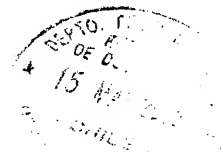
- Heat Shock Proteins Chaperone-60 and -10 of *Francisella tularensis* and Determination of the T-Cell Response to the Proteins in Individuals Vaccinated with *F. tularensis*. *Infection and Immunity* 65, 1824-1829.
- Enriquez R. (1999) Conferencia: Agentes Microbianos en Peces. XXI Congreso Chileno de Microbiología, Dr Janis Grinbergs M.
- Felgner P., Tsai Y., Sukhu L., Wheeler C., Manthorpe M., Marshall J. Y Cheng S. (1995). In DNA Vaccines: A new era in vaccinology. *Annals of the New York Acad. Sciences*. 772: 126- 139.
- Ferrero, R.L., Thiberge, J.M., Kansau, I., Wuscher, N., Huerre, M. and Labigne A. (1995). The GroES homolog of *Helicobacter pylori* confers protective immunity against mucosal infection in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6499-6503.
- Fryer, J.L., Lannan, C.N., Garces L.H., Larenas J.J y Smith P. A. (1990) Isolation of a rickettsiales-like organism from diseased coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in Chile. *Fish Pathol.* 25 (2): 107-114.
- Fryer, J.L., Lannan, C.N., Giovannoni, S.J., Wood, N.D. (1992). *Piscirickettsia salmonis* gen. nov., sp. nov., the causative agent of an epizootic disease in salmonid fishes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42:120-126.
- Fryer, J.L., Mauel M. J., (1997). The Rickettsia: an Emerging Group of Pathogens in Fish. *Emerging Infectious Diseases* 3 (2): 137-144.
- Gaggero, A. (1995) Procedimiento de obtención de una vacuna contra el síndrome rickettsial del salmon producido por la bacteria *Piscirickettsia salmonis*. Solicitud de Patente Chilena 01261-1995
- Hansen, E., Fernandez, K., Goldspink G., Butterworth, P., Urneda, P. K., Chang, K.C. (1991). Strong expression of foreign genes following direct injection into fish muscle. *FEBS* 290: 73-76.
- Herrmann, et al. DNA vaccines against rotavirus infections, United States Patent 6,165,993 . December 26, 2000
- Hilleman R. (1995). DNA Vectors. Precedents and Safety. In DNA Vaccine: A new era in Vaccinology. *Annals of the New York Acad. Sciences*-772: 1-14.
- Hoffman, S.L., D.L., Deelan, M. Sedegah, R. Granzinski, H. Wang, K. Gowda, P. Hobart, M. Margalith, J. Norman, R.C. Hedstrom. (1995). Nucleic acid malaria vaccines: Current status and potential. In DNA Vaccines: A new era in Vaccinology. *Annals of the New York Acad. Sciences* 772:140-151.



- Kanellos T., Sylvester I., Howard C. y Russell H. (1999). DNA is as effective as protein at inducing antibody in fish. *Vaccine*. 17: 965-972.
- Kansau, I., Labigne, A. (1996). Heat shock proteins of *Helicobacter pylori*. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 10 Suppl 1: 51-6.
- Kurth R. (1995) Risk Potential of the Chromosomal Insertion of Forcing DNA. In *DNA Vaccines: A new era in Vaccinology*. Annals of the New York Acad. Sciences 772: 88.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680.
- Larenas, J., Contreras, J., Smith, P. (1998). Estado Actual de la Piscirickettsiosis en Salmones. *Aquatic* 5:1-21.
- Liu ZJ., Zhu ZY., Roberg K., Faras A., Guise K., Kapuscinski AR., Hackett PB. (1990) Isolation and characterization of beta-actin gene carp (*Cyprinus carpio*). *DNA Seq.* 1(2):125-136
- Lowrie D.B., Silva C., Colston M., Ragno S., y Tascon R. (1997) Protection against tuberculosis by a plasmid DNA vaccine. *Vaccine* 15 (8): 834-838.
- Lozes, E., Huygen, K., Denis, O. y otros (1997) Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the antigen 85. *Vaccine* 15: 830.
- McClements, W.L. (1995). Prevention of lethal herpes simplex virus type-2 infection in mice by immunization with DNA. *IBC Conference on Gene Therapy & Nucleic Acid Vaccines Strategies*. Feb. 16-17, Bethesda, MD.
- McDonald, G.A., Anacker, R.L., Garjian, K. (1987) Cloned gene of *R. rickettsii* surface antigen. *Science* 235:83.
- Mehra, V., Bloom, B.R., Bajardi, A.C., Grisso, C.L., Sieling, P.A., Alland, D., Convit, J., Fan, X.D., Hunter, S.W., Brennan, P.J. (1992). A major T cell antigen of *Mycobacterium leprae* is a 10-Kd heat-shock cognate protein. *J. Exp. Med.* 175, 275-84.
- Montgomery, D.L., J.W. Shiver, K.R. Leander, H.C. Perry, A. Friedman, D. Martinez, J.B. Ulmer, J.J. Donnelly, M.A. Liu. (1993). Heterologous and homologous protection against influenza A by DNA vaccination: Optimization of DNA vectors. *DNA Cell Biol.* 12:777.



- Nichols, W.W., Ledwith B.J., Manam S.V., Troilo P.J.(1995). Potencial DNA vaccine integration into host cell genome. In DNA Vaccine: A new era in Vaccinology. Annals of the New York Acad. Sciences, 772: 30-39.
- Obach A., Galanti M. y Delhey R. (1998). Exitosa Investigación contra Rickettsia. Salmonoticias. N° 61. Pag. 10-11.
- Requena, J.M., Soto, M., Quijada, L. and Alonso, C. (1997). Antigenicity and immunogenicity of heat shock proteins. Ars. Pharmaceutica 38: 191-208.
- Rhodes, S.G., Gavier-Wilden, Buddle, B.M., Whealan, A.O., Signh, M., Hewinson, R.G., and Vordermier, Zügel, U. (2000). Antigen Specificity in Experimental Bovine Tuberculosis. Infection and Immunity. 68, 2573-2578.
- Robinson, H.L., L.A. Hunt, R.G. Webster. (1993). Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine 11: 957.
- Rouse, B.T.d 995). Genetic vaccines against herpes simplex virus. IBC conference on Gene Therapy & Nucleic Acid Vaccine Strategies, Feb. 16-17, Bethesda, MD.
- Russell, P.M., T. Kanellos, I.D. Sylvester, K.C. Chang, C.R. Howard. (1998). Nucleic acid immunization with a reporter gene results in antibody production in goldfish (*Carassius auratus L.*). Fish & Shellfish Immunology, 8(2): 121-128.
- Salmonoticias (Publicación de la Asociación de Productores de Salmón y Trucha de Chile A.G.) 1998: N°61, pag. 10-11; N°62, pag. 11; N° 63, pag. 29-31. 1999: N° 72, pag 4-6 y 18-19.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, C.S.H., New York.
- Sedegah, M., R. Hedstrom, P. Hobart, S.L. Hoffman. (1994). Protection against malaria by immunization with circumsporozoite protein plasmid DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.
- Smith, P.A., Contreras, J.R., Larenas, J.J., Aguillon, J.C., Garces, L.H., Fryer, J.L. (1997) Immunization with bacterial antigens: piscirickettsiosis. Dev. Biol. Stand. 90:161.
- Srivastava P.K. Heat shock protein 70 preparations in vaccination against cancer and infectious diseases. United States Patent 6,168,793, January 2, 2001.



- Srivastava P.K. Compositions and methods using complexes of heat shock protein gp96 and antigenic molecules for the treatment and prevention of infectious diseases. United States Patent 6,143,299, November 7, 2000
- Tang, D.C., M. Devit, S.A. Johnston.(1992). Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152.
- Sewell A., Gerth U., Price D., Purbhoo M., Boulter J., Gao G., Bell J., Phillips R. Y Jakobsen B.(1999) Antagonism of cytotoxic T-lymphocyte activation by soluble CD8. *Nature Medicine* 5(4): 399-404.
- Stover, C.K., Marana, D.P., Dash, G.A., Oaks, E.U. (1990) Molecular cloning and sequence analysis of the Sta58ma gene of *R. tsutsugamushi*. *Infect. Immunol.* 58:1360.
- Tamura A., Urakami H. Y Tsuruhara T. (1982) Purification of *Rickettsia tsutsugamushi* by percoll density gradient centrifugation. *Microbiol. Immunol.* 26(4): 321-328.
- Thole, J.E., Janson, A.A., Kifle, A., Howe, R.C., McLean, K., Nurilgyn, A., Filley, E., Shannon, E.J., Bulla, G.J., Hermans, J. (1995). Analysis of T-cell and B-cell responses to recombinant *M. leprae* antigen in leprosy patients and in healthy contacts: significant T-cell responses to antigens in *M. leprae*. *Int. J. Lepr. Other Mycobact. Dis.* 63, 369-380.
- Ulmer, J.B., J.J. Donnelly, S.E. Parker, G.H. Rhodes, P.L. Feigner, V.J. Dwarky, S.H. Gromkowski, R.R. Deck., C.M. De Witt, A. Friedman, L.A. Hawe, K.R. Leander, D. Martinez, H.C. Perry, J.W. Shiver, D.L. Montgomery, M.A. Liu. (1993). Heterologous protein against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science* 259: 1745.
- Whitton J., Rodriguez F., Zhang J., Hasset D.(1999). DNA Immunization: Mechanistic Studies. *Vaccine*. 17:1612-1619.
- Wolff, J.A., R.W. Malone, P. Williams, W. Chong, G. Acsadi, A. Jani, P.L. Feigner. (1990). Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. *Science* 247: 1465.
- Xiang, Z.Q., S. Spitalnik, M. Tran., W.H. Wunner., J. Cheng., H.C.J. Ertl. (1994). Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 199: 132.
- Xu, D., F.Y. Liew. (1994). Genetic vaccination against leishmaniasis. *Vaccine* 12: 1534.



- Yeanes, S., Ishi, N. (1990). Cloning of the oxidative stress-responsive genes in *Caenorhabditis elegans*. J. Radiat. Res. (Tokyo) 40 (1): 39-47.
- Zügel, U., Kaufmann, S.H.E. (1999a). Immune Response against Heat Shock Proteins in Infectious Diseases. Immunobiology 201, 22-35.
- Zügel, U. and Kaufmann, S.H.E. (1999b). Role of Heat Shock Proteins in Protection From and Pathogenesis of Infectious Diseases. Clinical Microbiology Reviews 12, 19-39.

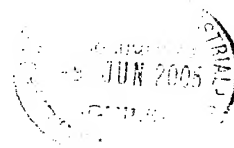


REIVINDICACIONES

1. Una vacuna de ADN, **CARACTERIZADA** porque comprende un fragmento de ADN, correspondiente a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta, que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP 10) de *Piscirickettsia salmonis* una región inmunogénica de ésta, insertado en un plásmido vector adecuado para expresar la proteína y generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.
2. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 1, **CARACTERIZADA** porque dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado.
3. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 1, **CARACTERIZADA** porque dicha proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácidica Sec Id N° 2 o una región inmunogénica de ésta.
4. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 3, **CARACTERIZADA** porque dicho plásmido vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del RNA mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.
5. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 4, **CARACTERIZADA** porque dicho plásmido vector es el plásmido pUK21-A2 u otro con características similares.



6. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 4, **CARACTERIZADA** porque dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
7. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 5, **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es el salmón coho.
8. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 5, **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
9. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 5, **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es el salmón chinook.
10. Una vacuna de ADN de acuerdo a la reivindicación 5, **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es la trucha.
11. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 10, **CARACTERIZADA** porque dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización y la inmersión.
12. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 11, **CARACTERIZADA** porque dicha vacuna comprende además una adjuvante adecuado.
13. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 12, **CARACTERIZADA** porque dicha vacuna comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.
14. Un método para detectar la presencia de anticuerpos contra el HSP-10 generados por la vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 13, **CARACTERIZADO** porque después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra el HSP-10



mediante ELISA u otro procedimiento conocido en el estado de la técnica para detectar anticuerpos.

15. Un procedimiento para la preparación de la vacuna de ADN contra *Piscirickettsia salmonis*, **CARACTERIZADO** porque comprende las siguientes etapas:

- a) Clonar el fragmento de ADN, correspondiente a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta, que codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP 10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de ésta
- b) Insertarlo en un plásmido vector adecuado para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.

16. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 15, **CARACTERIZADO** porque dicho fragmento de ADN corresponde a una secuencia nucleotídica que da origen a la misma proteína o fragmento de proteína que la Sec Id N° 1, empleando codones diferentes, preferentemente los codones más usados por el organismo vertebrado a ser vacunado.

17. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 15, **CARACTERIZADO** porque dicha proteína de estrés térmico 10 de *Piscirickettsia salmonis* corresponde a la secuencia aminoácídica Sec Id N° 2 o una región inmunogénica de ésta.

18. Un procedimiento de acuerdo la reivindicaciones 15 a 17, **CARACTERIZADO** porque dicho plásmido vector adecuado presenta las siguientes características a) un promotor fuerte, usualmente del tipo viral que no sea tejido-específico; b) un sitio de clonamiento para la inserción del gen de interés; c) un sitio de poliadenilación para detener la transcripción del RNA mensajero; d) un origen de replicación procariótico para una eficiente propagación en cultivos de *E. coli*; y e) un marcador de selección.

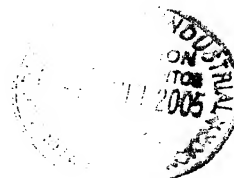
19. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 18, **CARACTERIZADO** porque dicho plásmido vector es el plásmido pUK21-A2 u otro con características similares.



20. Un procedimiento de acuerdo la reivindicaciones 15 a 19, **CARACTERIZADO** porque dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
21. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 20, **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es el salmón coho.
22. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 20, **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
23. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 20, **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
24. Un procedimiento de acuerdo la reivindicación 20, **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es la trucha.
25. Un segmento de ADN purificado útil ^{para} la producción de una vacuna contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados, **CARACTERIZADO** porque dicho segmento de ADN, correspondiente a la secuencia nucleotídica Sec Id N° 1 o un fragmento de ésta, codifica para la proteína de estrés térmico 10 (HSP 10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta.
26. Un segmento de ADN purificado de acuerdo ^a la reivindicación 25, **CARACTERIZADO** porque corresponde a una secuencia nucleotídica equivalente a Sec Id N° 1, de acuerdo al código genético o un fragmento de ésta.
27. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a las reivindicaciones 25 a 26 **CARACTERIZADO** porque sirve para preparar un medicamento útil para la generación de respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados.
28. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 27 **CARACTERIZADO** porque dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.

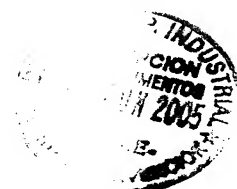


29. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 28 **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es el salmón coho.
30. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 28 **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
31. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 28 **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
32. Uso de un segmento de ADN purificado de acuerdo a la reivindicación 28 **CARACTERIZADO** porque dicha especie de acuicultura es la trucha.
33. Una vacuna recombinante para generar respuesta inmune contra *Piscirickettsia salmonis* en vertebrados producida empleando el segmento de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 28 a 30, **CARACTERIZADA** porque la proteína de estrés térmico 10 (HSP 10) de *Piscirickettsia salmonis* o una región inmunogénica de esta se produce empleando un vector de expresión y un hospedero adecuado.
34. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 33 **CARACTERIZADA** porque dicho vertebrado corresponde a una especie de acuicultura.
35. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 34 **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es el salmón coho.
36. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 34 **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es el salmón del Atlántico.
37. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 34 **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es el salmón Chinook.
38. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 34 **CARACTERIZADA** porque dicha especie de acuicultura es la trucha.



39. Una vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 33 a 38 **CARACTERIZADA** porque dicho vector de expresión es un plásmido u otra construcción de ADN capaz de expresar la proteína HSP10 ó una proteína de fusión que la contenga, en un hospedero adecuado.
40. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 39 **CARACTERIZADA** porque dicho plásmido es preferentemente el vector pET32a.
41. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 33 a 40 **CARACTERIZADA** porque dicho hospedero es un microorganismo, una célula de insectos o una célula animal.
42. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 41 **CARACTERIZADA** porque dicho hospedero es preferentemente *E. coli*.
43. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 33 a 42, **CARACTERIZADA** porque dicha vacuna se administra mediante técnicas adecuadas, seleccionadas del grupo consistente en inyección intramuscular, la pulverización y la inmersión.
44. Una vacuna recombinante de acuerdo a la reivindicación 33 a 42, **CARACTERIZADA** porque dicha vacuna comprende además una adjuvante adecuado.
45. Una vacuna de ADN de acuerdo a las reivindicaciones 33 a 44, **CARACTERIZADA** porque dicha vacuna comprende además un transportador farmacéuticamente aceptable.
46. Un método para detectar la presencia de anticuerpos contra el HSP-10 generados por la vacuna recombinante de acuerdo a las reivindicaciones 33 a 45, **CARACTERIZADO** porque después de un tiempo se extrae sangre del vertebrado vacunado y el suero se analiza por la presencia de anticuerpos contra el HSP-10

mediante ELISA u otro procedimiento conocido en el estado de la técnica para detectar anticuerpos.



ATGAAAATCCGTCCATTACATGACCGCGTTGTAATTCGTCGTCTGGAAG
AAGAACTACTTCTGCTGGCGGCATCATCTTAACTGGCAGCGCACAGA
AAAGCCAAACCGTGGTGAAGTGGTTGCTGTAGGTCGTGGTAAAGCGTTG
GATAACGGCGACTACCGCCCGATTGATGTCGCAGTTGGTAGCACTGTAT
TGTTTGGCCAATATTCAGGCTCAACAGTGAAGATCGATGGCGAAGAGTA
TCAGGTGATGCGTGAAGACGAAATCTTGCAGTCGTTGAAGATTAA

FIGURA 1



MKIRPLHDRVVIRRLEEETTSAGGIILTGSA
QEKPNRGEVVAVGRGKALDNGDYRPIDVAVG
STVLFGQYSGSTVKIDGEEYQVMREDEIFAV
VED

FIGURA 2



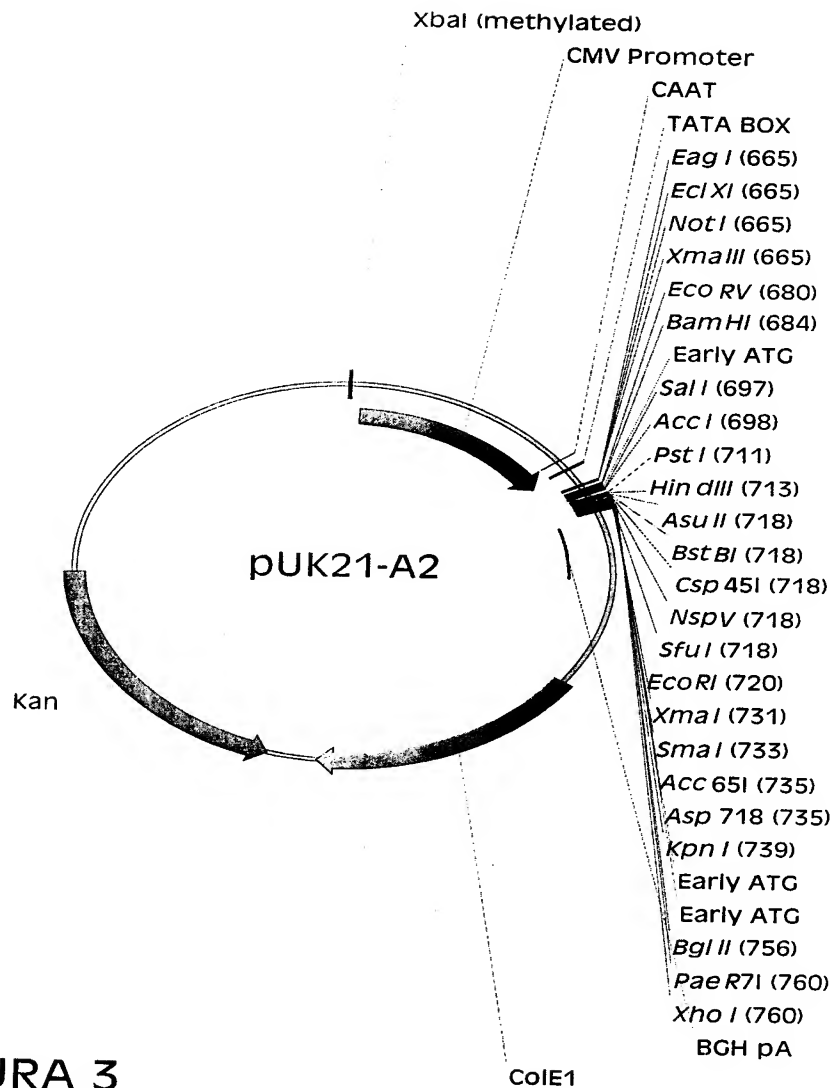
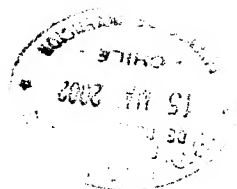


FIGURA 3



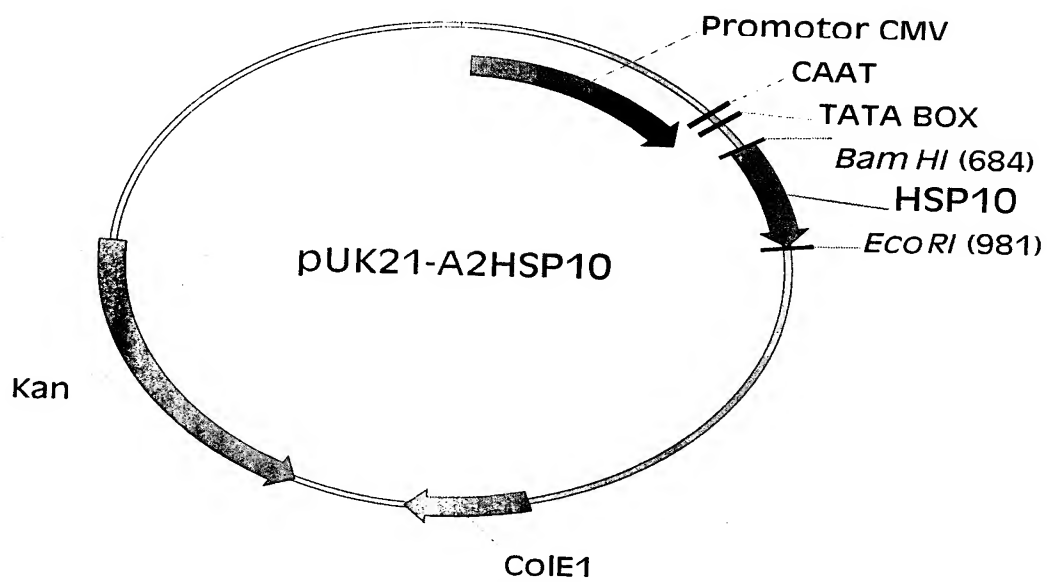


FIGURA 4



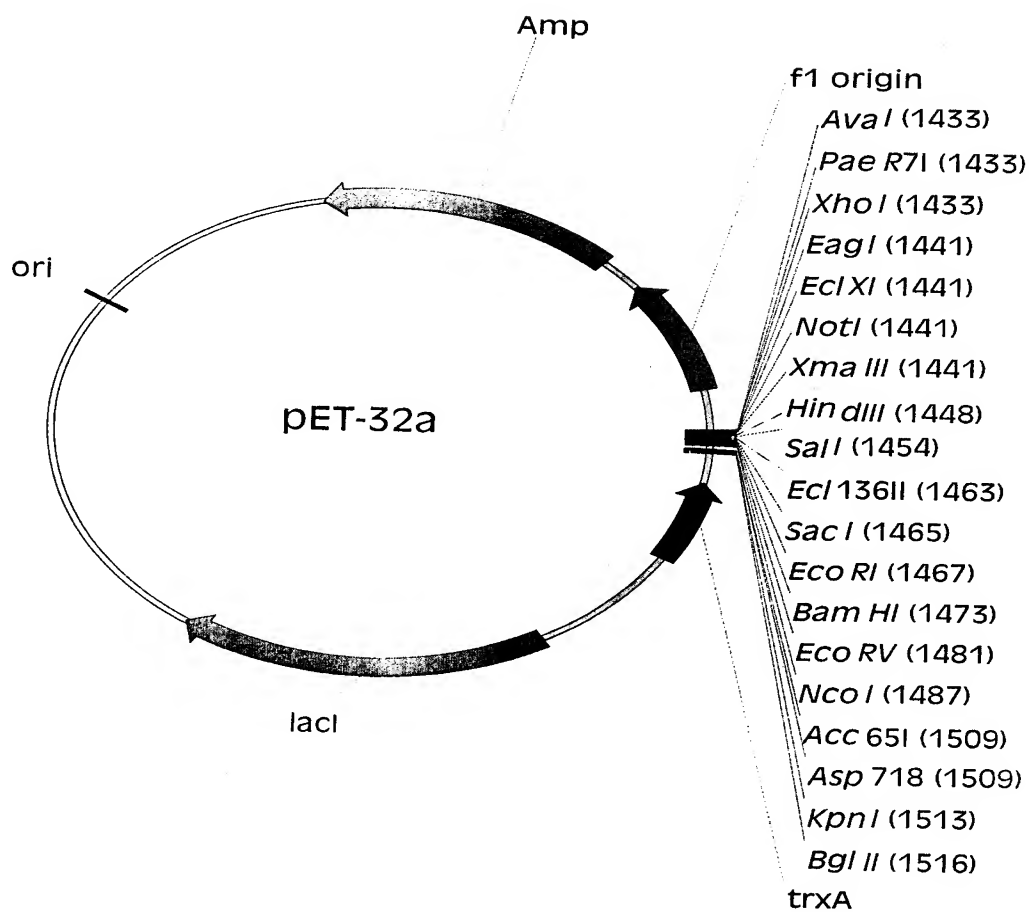


FIGURA 5



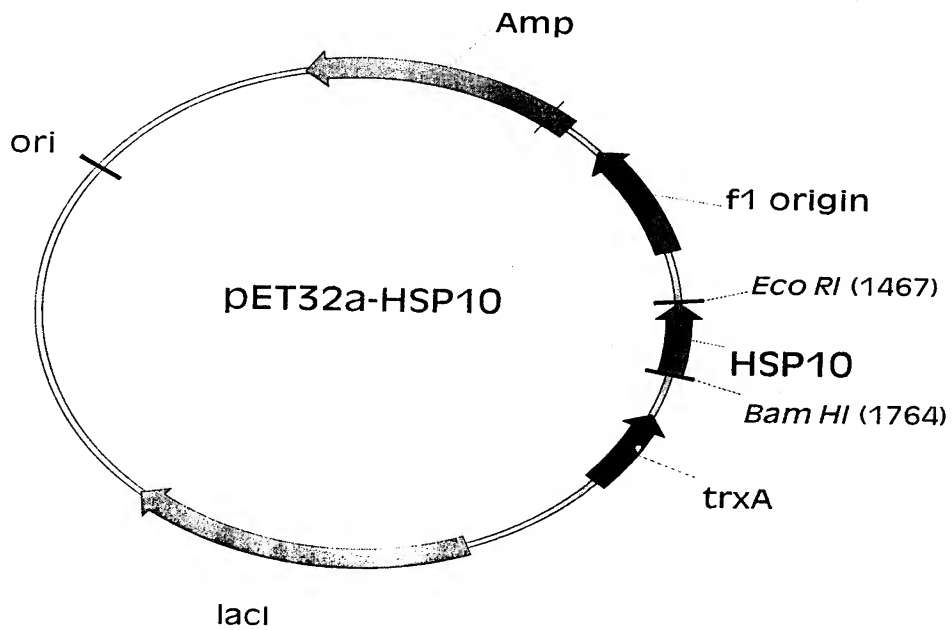


FIGURA 6

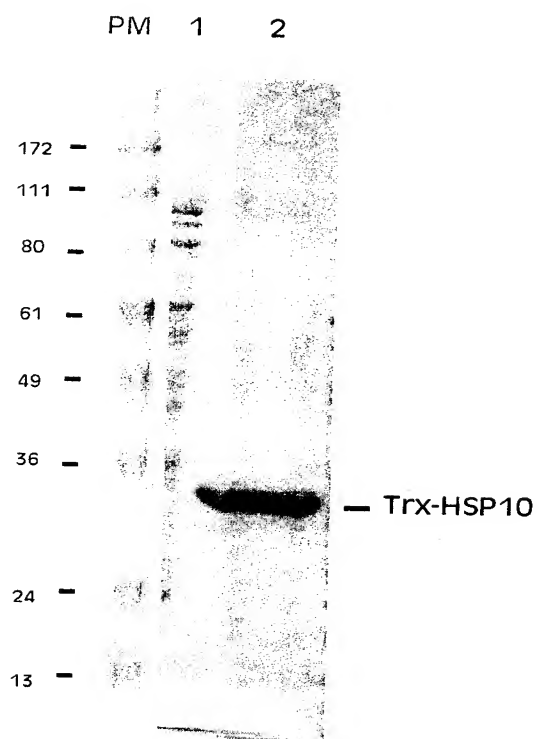


FIGURA 7